



HAL
open science

Identification et dispersion des bioaérosols générés lors du compostage

Olivier Le Goff

► **To cite this version:**

Olivier Le Goff. Identification et dispersion des bioaérosols générés lors du compostage. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2010. Français. NNT: . tel-02822143

HAL Id: tel-02822143

<https://hal.inrae.fr/tel-02822143>

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'UNIVERSITE DE MONTPELLIER II

spécialité : Ecosystème

Ecole Doctorale : SIBAGHE

Présentée par

Olivier LE GOFF

**“Identification et dispersion
des bioaérosols générés lors du
compostage”**

Soutenue publiquement le 18 Novembre 2010

Devant la commission d'examen composée de :

M ^{me}	Brigitte BRUNEL	Laboratoire d'étude des symbioses tropicales et méditerranéennes Montpellier	Présidente
M ^{me}	Laurence MATHIEU	Laboratoire d'Hydroclimatologie médicale Environnement Santé Nancy	Rapporteur
M.	Patrick DABERT	CEMAGREF Rennes	Rapporteur
M ^{me}	Isabelle DÉPORTES	ADEME Angers	Examinatrice
M ^{elle}	Nathalie WÉRY	Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement INRA Narbonne	Co-encadrante
M.	Jean-Jacques GODON	Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement INRA Narbonne	Directeur de thèse

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'UNIVERSITE DE MONTPELLIER II

spécialité : Ecosystème

Ecole Doctorale : SIBAGHE

Présentée par

Olivier LE GOFF

**“Identification et dispersion
des bioaérosols générés lors du
compostage”**

Soutenue publiquement le 18 Novembre 2010

Devant la commission d'examen composée de :

M ^{me}	Brigitte BRUNEL	Laboratoire d'étude des symbioses tropicales et méditerranéennes Montpellier	Présidente
M ^{me}	Laurence MATHIEU	Laboratoire d'Hydroclimatologie médicale Environnement Santé Nancy	Rapporteur
M.	Patrick DABERT	CEMAGREF Rennes	Rapporteur
M ^{me}	Isabelle DÉPORTES	ADEME Angers	Examinatrice
M ^{elle}	Nathalie WÉRY	Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement INRA Narbonne	Co-encadrante
M.	Jean-Jacques GODON	Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement INRA Narbonne	Directeur de thèse

Remerciements

Trugarez

Ce travail de thèse a été réalisé avec le concours de l'ADEME et de la région Languedoc Roussillon. Ma quête narbonnaise se termine et avec elle les trois ans passés dans le Sud.

Je remercie **Jean-Phillipe Delgenès**, directeur de l'unité, de m'avoir accueilli au laboratoire, ainsi que son successeur **Jean-Phillipe Steyer** pour leur disponibilité et leur bonne humeur.

J'adresse mes remerciements à **Jean-Jacques Godon** et **Nathalie Wéry** pour leur confiance, leur encadrement et leur investissement au sein de cette thèse.

Je tiens à remercier les membres du jury : **Brigitte Brunel**, **Laurence Mathieu**, **Isabelle Déportes** et **Patrick Dabert** pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Un merci à Isabelle Déportes, pour sa sympathie, ses conseils et d'avoir pris le temps de décortiquer et de commenter ces fameux rapports ADEME !

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse : **Enric Robine**, **Anne Marie Delort**, **Cindy Morris**, **Isabelle Déportes** et **Phillipe Hinsinger** pour leurs conseils, leurs remarques pertinentes tout au long de ces trois années.

Merci aux personnes qui ont séjourné (**Caroline**, **Bruno**, **Marie**, **Fériel**, **Didier**, **Matthieu** et **Catherine**), et à celles qui ont franchi le seuil du "bureau du fond" considéré comme un morceau de la Bretagne résistant à l'invasion Occitane. Merci à toi la mascotte, faite de brics et de brocs, "Ô Dieu de la Bio-Mol qui a veillé sur une partie de mes manip" ainsi qu'à **Catherine**, **Matthieu** et **Anaïs** pour la fabrication et pour tous les bons moments passés. Maintenant Matthieu, c'est à ton tour, bon courage.

Je remercie pour votre aide, vos conseils et votre bonne humeur : **Jérôme**, **Gaëlle** et **Valérie**. Comment ne pas remercier le logiciel "ARB", nom connu de tout Breton et qui est aussi têtu !

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement pour leur sympathie qui ont fait de ces trois années un beau séjour qui restera pour moi impérissable, ainsi qu'à tous les thésards du laboratoire pour leur discussion et leur bonne humeur : **Adeline**, **Carole**, **Sarah**, **Yan**, **Juan**... bon courage pour la suite.

Je tiens également à remercier les membres de Véolia Environnement, partenaire du projet, qui nous a permis d'effectuer les prélèvements sur les plates-formes de compostage.

J'ai une pensée pour mes compagnons d'aventures : Valentin, Aurore, Virginie et Anne Laure qui eux aussi ont ou vont soutenir.

Je suis reconnaissant aux "petites bêtes" qui ont bien voulu être collectées lors des nombreuses campagnes et sacrifiées sur l'autel de la science, indispensables à l'aboutissement de cette thèse.

J'adresse un grand merci à Jean-Yves, Dominique ainsi qu'à Jeanne et Klaus pour les relectures pertinentes.

“ J'aime tous les accents. C'est le sel de la parole et la seule différence qui la sépare de l'écriture. Non seulement l'accent révèle un être humain, ”
mais je me plais à croire qu'il traduit un peu le pays où il vit.

Pierre Jakez Hélias (Lettres de Bretagne, 1978)

Table des matières

Introduction	23
I Contexte bibliographique	25
Introduction	27
1 Les aérosols	29
1.1 Définition	30
1.2 Les sources des aérosols	30
1.2.1 Les sources naturelles	31
1.2.1.1 Les océans	31
1.2.1.2 La phyllosphère	32
1.2.1.3 Les régions désertiques	32
1.2.1.3.1 Les régions désertiques chaudes	33
1.2.1.3.2 Les régions désertiques froides	34
1.2.2 Les sources anthropiques	35
1.2.2.1 les activités agricoles	35
1.2.2.2 Le milieu urbain	38
1.2.2.3 Les industries	39
1.2.2.4 L'environnement intérieur	39
1.2.2.5 Les procédés de dépollution	40
1.3 Notion de bruit de fond dans l'air	41
1.4 Les mécanismes d'aérosolisation, de transport et de sédimentation	42
1.4.1 L'aérosolisation	42
1.4.1.1 Aérosolisation au sein de l'environnement aquatique	42
1.4.1.2 Aérosolisation au sein de l'environnement terrestre	44
1.4.1.3 Mesure du flux de micro-organismes émis	46
1.4.1.4 Mécanismes d'aérosolisation des champignons	48
1.4.1.4.1 Emission active	48
1.4.1.4.2 Emission passive	48
1.4.2 Le transport dans l'air	49

1.4.2.1	La circulation atmosphérique	49
1.4.2.2	Forces exercées sur les particules aérosolisées	49
1.4.2.3	La taille des bioaérosols	51
1.4.3	La sédimentation	52
1.4.3.1	Le dépôt sec	52
1.4.3.2	Le dépôt humide	55
2	La microbiologie des aérosols	57
2.1	Introduction	59
2.2	Composition microbienne	59
2.2.1	La structure des populations microbiennes dans l'air	59
2.2.2	L'état physiologique des micro-organismes	73
2.2.2.1	La sporulation	73
2.2.2.2	La viabilité	73
2.2.2.3	L'activité des micro-organismes	74
2.3	Dynamique temporelle et spatiale des bioaérosols	76
2.3.1	Variation temporelle	76
2.3.1.1	Variation saisonnière	76
2.3.1.2	Variation nyctémérale	79
2.3.2	Variation spatiale	80
2.3.3	Variation des concentrations microbiennes au sein de la colonne d'air	81
2.4	Les mécanismes de survie des micro-organismes	82
2.4.1	Les facteurs météorologiques	82
2.4.1.1	La température	82
2.4.1.2	L'humidité relative	84
2.4.2	Les radiations	85
2.4.3	Les nutriments présents dans l'atmosphère	85
2.5	Les impacts sanitaires associés aux bioaérosols	86
2.5.1	La réaction infectieuse	87
2.5.1.1	La transmission	87
2.5.1.2	L'inhalation	87
2.5.1.3	La dose infectante	89
2.5.2	La réaction allergique et ou inflammatoire	89
2.5.2.1	La broncho-pneumopathie obstructive	90
2.5.2.2	Le syndrome toxique de la poussière organique	90
2.5.2.3	La pneumonie d'hypersensibilité	90
2.5.2.4	L'asthme professionnel	90
2.5.3	Les toxines	91
2.5.3.1	Les mycotoxines	91
2.5.3.2	Les glucanes	91
2.5.3.3	Les endotoxines	91

2.5.4	Les études épidémiologiques	92
2.5.4.1	Etudes épidémiologiques dans les industries	92
2.5.4.2	Etudes épidémiologiques dans les procédés de dépollution en milieu professionnel	94
2.5.4.3	Etudes épidémiologiques auprès des riverains	95
3	Bioaérosols émis lors des procédés de dépollution	97
3.1	Introduction	99
3.2	Les centres de stockage	99
3.2.1	Principe de fonctionnement	99
3.2.2	Concentration et communauté microbienne des bioaérosols	100
3.2.3	Dispersion des bioaérosols	103
3.3	Les stations d'épuration	105
3.3.1	Principe de fonctionnement	105
3.3.2	Le bioaérosol émis en fonction des étapes du traitement	105
3.3.3	La dispersion des bioaérosols de stations d'épuration	110
3.4	La digestion anaérobie	111
3.4.1	Principe de fonctionnement	111
3.4.2	La composition des bioaérosols formés dans les méthaniseurs	112
3.5	L'épandage	114
3.5.1	Généralités	114
3.5.2	Dispersion du bioaérosol émis lors de l'épandage de boues de stations d'épuration	115
3.5.3	Caractérisation du bioaérosol émis lors de l'épandage de boues de station d'épuration	116
3.6	Le compostage	119
3.6.1	Définition	119
3.6.2	Les plates-formes de compostage	119
3.6.2.1	Les différentes étapes du procédé	120
3.6.2.1.1	Réception des déchets	121
3.6.2.1.2	Fermentation	122
3.6.2.1.3	Phase de refroidissement	123
3.6.2.1.4	Maturation	123
3.6.2.1.5	Criblage	123
3.6.2.1.6	Valorisation	124
3.6.2.2	Diversité microbienne au sein du compost	125
3.6.2.3	Caractérisation des bioaérosols de compostage	133
3.6.2.3.1	Les différents types d'émissions des bioaérosols	133
3.6.2.3.2	Les principales activités génératrices des bioaérosols	133
3.6.2.3.3	La diversité microbienne des bioaérosols	142
3.6.2.3.4	La dispersion des bioaérosols	144

3.7	Réglementation française associée aux émissions atmosphériques des procédés de dépollution	148
3.7.1	Les centres de stockage des déchets ultimes	149
3.7.2	Les plates-formes de compostage	149
3.7.3	Les valeurs guides pour les bioaérosols	152
4	Techniques de collecte et d'analyse des bioaérosols	155
4.1	Méthode de collecte	157
4.1.1	L'impaction	157
4.1.1.1	L'impaction sur milieu solide	157
4.1.1.2	L'impaction sur support adhésif	160
4.1.1.3	L'impaction en milieu liquide	160
4.1.1.4	L'impaction centrifuge	161
4.1.2	La filtration	162
4.1.3	La sédimentation	163
4.1.4	Précipitation électrostatique	164
4.1.5	La collecte des virus	164
4.1.6	L'efficacité des collecteurs	164
4.2	La caractérisation des bioaérosols	168
4.2.1	Les méthodes chimiques	172
4.2.1.1	Détection des micro-organismes	172
4.2.1.1.1	L'adénosine triphosphate	172
4.2.1.1.2	L'acide muramique	172
4.2.1.1.3	L'ergostérol	172
4.2.1.1.4	Les glucanes	172
4.2.1.1.5	Les polysaccharides extracellulaires	172
4.2.1.1.6	Les mycotoxines	173
4.2.1.2	Détection des endotoxines	173
4.2.1.3	Détection par PLFA	174
4.2.2	Les méthodes culturales	175
4.2.3	Les méthodes microscopiques	176
4.2.3.1	Comptage direct	177
4.2.3.2	Comptage par épifluorescence	177
4.2.3.3	La microscopie électronique	177
4.2.4	La cytométrie en flux	178
4.2.5	Les méthodes moléculaires	178
4.2.5.1	Amplification de l'ADN	178
4.2.5.2	L'ADN ribosomique	179
4.2.5.3	Les études des communautés	181
4.2.5.3.1	Le clonage-séquençage	181
4.2.5.3.2	Les empreintes moléculaires	182

a) L'ARDRA – RFLP	182
b) La DGGE	182
c) La SSCP	183
d) L'ARISA	184
4.2.5.4 La quantification	184
4.2.5.4.1 La PCR quantitative	184
4.2.5.4.2 Les puces à ADN	186
4.2.6 Avantages et inconvénients des différentes techniques	188
II Résultats	195
5 Signature microbienne des bioaérosols émis lors de la phase de fermentation	197
6 Développement d'indicateurs microbiens spécifiques afin de tracer les bioaérosols émis par les plates-formes de compostage en utilisant la PCRq	217
7 Choix d'indicateurs pertinents pour l'analyse de la dispersion des bioaérosols émis sur les plates-formes de compostage	243
III Discussion	265
IV Références bibliographiques	275
V Annexe	303
A Matériel supplémentaire provenant de l'article 1	305

Table des figures

1.1	Taille des micro-organismes présents dans les bioaérosols (Pepper and Dowd, 2009)	30
1.2	Planisphère représentant les principaux biomes (Burrows et al., 2009a) . . .	31
1.3	Planisphère présentant les trajectoires des principaux aérosols émis par les déserts (Kellogg and Griffin, 2006)	34
1.4	Aérosolisation dans les environnements aquatiques (Blanchard and Syzdek, 1982)	42
1.5	Aérosolisation à partir du sol dans les environnements terrestres (source wikipédia)	45
1.6	Diagramme de Hjulström permettant de connaître l'activité d'une particule en fonction de sa taille et de la vitesse du vent	46
1.7	Forces exercées sur les particules aérosolisées	50
1.8	Distribution des particules sur lesquelles les bactéries sont agglomérées dans l'air (à gauche), tandis qu'à droite, le graphique représente les bactéries libres et les bactéries associées aux particules (Lighthart, 1997)	51
1.9	Tailles et vitesses de sédimentation de certains micro-organismes (Stetzenbach, 1992)	54
2.1	Les différentes voies de détection des bactéries viables (Keer and Birch, 2003)	73
2.2	Dénombrement des bactéries viables par la méthode DVC (technique couplée au FISH pour la détection d' <i>Escherichia coli</i>) La flèche indique une cellule qui s'est allongée (viable) (Wu et al., 2009)	74
2.3	Variation de la concentration bactérienne et fongique au cours de l'année. La méthode de collecte a été réalisée par impaction (collecteur Andersen) et le dénombrement par culture (Lighthart, 1997)	77
2.4	Variations saisonnières de la concentration de spores aérosolisées de différents champignons (Herrero et al., 2006)	78
2.5	Variation de la concentration bactérienne au cours d'une journée (Lighthart, 1997)	79

2.6	Estimation de la densité microbienne en fonction de l'altitude d'après Yang <i>et al.</i> , 2010.	82
2.7	Variation de la température (■) et de la pression dans la troposphère (×) .	83
2.8	Effets des radiations sur les micro-organismes	85
2.9	Concentrations en particules aérosolisées par l'homme (Cloutier, 2007) . . .	87
2.10	Arbre respiratoire de l'homme. Le dépôt des particules selon la taille est représentée : en jaune 5-30 µm, en orange 1-5 µm et en mauve < à 1 µm . .	88
3.1	Principe d'un centre de stockage de déchets ultimes (http://www.biltagarbi.fr)	100
3.2	Schéma d'une station d'épuration des eaux usées employant le traitement par les boues activées (Aussel <i>et al.</i> , 2004)	105
3.3	Les différents lieux d'aérosolisation des micro-organismes au sein d'une station d'épuration	106
3.4	Concentration dans l'air des bactéries mésophiles lors du traitement des eaux usées sur 6 stations d'épuration (STEP) (Sanchez-Monedero <i>et al.</i> , 2008). Les lettres a, b et c indiquent qu'il n'y a pas de différence significative d'après le test de Duncan $p < 0,05$	107
3.5	Les différentes étapes de la digestion anaérobie	112
3.6	Epandage sur les terres agricoles et formation d'un bioaérosol	115
3.7	Evolution du nombre de plates-formes de compostage en France depuis 2004, de la quantité de déchets entrants (■) et du compost produit (×) exprimé en tonnes de matière brute	120
3.8	Les différentes étapes du procédé de compostage	121
3.9	Les différentes voies de valorisation du compost en France, en 2008 (source ADEME)	124
3.10	Différentes phases du compostage en fonction de la température, (Mustin, 1987). La température est mentionnée par le trait plein tandis que le pH est indiqué en pointillé	125
3.11	Répartition des phyla bactériens dans l'environnement compost (séquences obtenues à partir de rdp10 (http://rdp.cme.msu.edu/))	126
3.12	Abondance relative des bactéries, champignons et actinomycètes au cours du procédé de compostage (Ryckeboer <i>et al.</i> , 2003a)	130
3.13	Dynamique des différents phyla bactériens au cours du compostage (Takaku <i>et al.</i> , 2006)	132
3.14	Concentrations des bactéries mésophiles et d' <i>Aspergillus fumigatus</i> lors des différentes activités de compostage (Sanchez-Monedero and Stentiford, 2003)	134
3.15	Concentration des micro-organismes dans les bioaérosols générés lors d'une activité de retournement sur deux plates-formes de compostage traitant des ordures ménagères (Fischer <i>et al.</i> , 2008)	145
4.1	Principe de l'impaction sur milieu solide	158

4.2	Collecteur multi-étages Andersen, (Andersen, 1958)	159
4.3	Principe de l'impacteur centrifuge (Maier et al., 2009)	162
4.4	Collecteur sédimentaire, (Sahu et al., 2005)	163
4.5	Représentation de l'influence de l'écoulement d'air sur le processus de cap- tage des bioaérosols (Renoux and Boulaud, 1998)	165
4.6	Composition d'une endotoxine (INRS, 2010)	174
4.7	Zones conservées et zones variables au sein de l'ADNr 16S. La variabilité de chaque base est indiquée par le code couleur (Van de Peer et al., 1996) .	180
4.8	Principe du séquençage selon la méthode Sanger et selon le pyroséquençage	182
4.9	Principe de la SSCP	184
4.10	Principe de la PCR quantitative avec le SYBR Green	185
4.11	Principe de la PCR quantitative avec le système TaqMan	186
4.12	Principe d'une puce à ADN (http://www.transcriptome.ens.fr)	187
6.1	Phylogenetic positioning of NA07 (A), NC38 (B) and EQ05 (C) based on partial 16S rDNA and 18S rDNA sequences. Bootstrap values over 50% are indicated at nodes. The sequences used to out-group were the 16S rDNA sequence of <i>Escherichia coli</i> strain K12 (U00096) for the bacteria and the 18S rDNA sequence of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Z75578) for the fungi. The sequences underlined represented the sequences which are amplified by the primer pairs at zero mismatch. The sequences in bold are the sequences that match by the probe at zero mismatch. The box indicates the sequences amplified by the whole qPCR system.	230
6.2	Concentration of NA07 in air samples collected in natural environments and on five composting platforms during the turning of composting piles in thermophilic phase (upwind and downwind of the turning activity). Crosses indicate the limit of quantification for each sample.	234
6.3	Concentration of NC38 in air samples collected in natural environments and on five composting platforms during the turning of composting piles in thermophilic phase (upwind and downwind of the turning activity). Crosses indicate the limit of quantification for each sample.	235
6.4	Concentration of EQ05 in air samples collected in natural environments and on five composting platforms during the turning of composting piles in thermophilic phase (upwind and downwind of the turning activity). Crosses indicate the limit of quantification for each sample.	236
7.1	Differences in logarithmic units between air samples collected during tur- ning of compost windrows in thermophilic phase and the background concen- tration (value on y-axis to zero)	257

7.2	Differences in logarithmic units between air samples collected in downwind during turning of compost windrows and the background (value on y-axis to zero)	259
7.3	Dispersal of NA07, NC38, EQ05 and viable bacteria during a turning activity on the twelve composting platforms. Regression curves were represented when the correlation coefficient was higher or equal at 90%.	260
7.4	Diagramme de Venn indiquant les relations en terme de phylotypes bactériens ou fongiques entre les différents bioaérosols	269

Liste des tableaux

1.1	Concentrations des bactéries aérosolisées dans différents environnements agricoles (Burrows et al., 2009b)	36
1.2	Les différentes activités agricoles générant des bioaérosols (Gilbert and Duchaine, 2009)	37
1.3	Concentration bactérienne aérosolisée dans l'air urbain (Burrows et al., 2009a)	38
1.4	Industries générant des bioaérosols (Gilbert and Duchaine, 2009)	39
1.5	Les différents composés émis dans l'atmosphère classés selon leur origine (Minivielle-Moncia, 2003)	41
1.6	Quantification de l'aérosolisation d'après le facteur de concentration	43
1.7	Flux des micro-organismes provenant de l'atmosphère	47
1.8	Vitesse de sédimentation de quelques particules selon la loi de Stokes (Pepper and Dowd, 2009)	52
2.1	Genres microbiens identifiés par culture dans des échantillons d'air	59
2.2	Diversité microbienne de l'air dans différents environnements (exprimé en pourcentage du nombre total de séquences d'ADNr 16S)	62
2.3	Diversité fongique dans l'air prélevé dans différents environnements (exprimé en pourcentage du nombre total de séquences d'ADNr)	71
2.4	Les principaux micro-organismes identifiés dans des bioaérosols issus d'activités agricoles ou industrielles (Gilbert and Duchaine, 2009)	72
2.5	Classification des micro-organismes en fonction de la température	75
2.6	Concentration des micro-organismes présents dans l'air de différents environnements	81
2.7	Les principaux composés organiques retrouvés dans les nuages (Puy de Dôme 2001-2008) (Vaitilingom et al., 2010)	86
2.8	Les effets sanitaires potentiels des principaux micro-organismes aérosolisés ou de leurs métabolites	89
2.9	Etudes épidémiologiques dans les milieux industriels autres que les procédés de dépollution, (Poulsen et al., 1995)	93

2.10	Récapitulatif des différentes études épidémiologiques au sein du milieu professionnel	94
3.1	Concentrations des micro-organismes dans les bioaérosols provenant de centre de stockage des déchets ultimes	101
3.2	Concentrations bactériennes et fongiques aux alentours des centres de stockage	104
3.3	Concentration moyenne des micro-organismes et des endotoxines lors des différentes phases du traitement des effluents papetiers (Marchard <i>et al.</i> , 1995)	109
3.4	Diversité bactérienne dans le biogaz et dans les digesteurs anaérobies (fréquence des phylotypes) (Moletta et al., 2007)	113
3.5	Composition bactérienne détectée dans les différents environnements	117
3.6	Contenu microbien dans les déchets (Deportes et al., 1995; Schlosser, 2007)	128
3.7	Concentration microbienne au sein des bioaérosols émis sur les plates-formes de compostage	135
3.8	Comparaison entre les concentrations en micro-organismes dans l'air et celles mesurées sur des plates-formes de compostage (Hryhorczuk et al., 2001)	140
3.9	Concentration microbienne en amont et lors de l'activité de retournement sur deux plates-formes de compostage (Fischer et al., 2008)	141
3.10	Fréquence en pourcentage des genres fongiques identifiés dans les bioaérosols émis dans la zone de réception et lors du retournement (Tolvanen et al., 2005)	142
3.11	Répartition en pourcentage des phyla bactériens et fongiques au sein d'un bioaérosol de compostage collecté lors du criblage d'un compost de déchets verts en stade maturation (Bru-Adan et al., 2009)	143
3.12	Distance à partir de laquelle le bioaérosol de compostage est similaire au bruit de fond de l'air	147
3.13	Les différentes contraintes selon la taille des plates-formes de compostage	150
3.14	Valeurs maximales d'odeurs en fonction de l'éloignement de l'installation (arrêté du 7 janvier 2002)	151
3.15	Valeurs guides proposées dans l'environnement de travail	152
4.1	Les six étages de l'impacteur Andersen avec la correspondance avec le tractus respiratoire humain (http://www.pacwill.ca/en/ProductsServices/6stage.htm)	160
4.2	Diamètre de coupure de différents biocollecteurs (CSTB, 2006)	166
4.3	Les différentes techniques employées pour analyser les bioaérosols	169
4.4	Différents milieux de culture pour les micro-organismes	176
4.5	Paramètres mesurés en cytométrie en flux (http://cytobase.monp.inserm.fr)	178
4.6	Avantages et inconvénients des techniques	189

6.1	Characteristics of compost windrows and meteorological conditions air sampling	223
6.2	Quantitative real-time PCR systems	225
6.3	Abundancy of the three indicators based on the number of sequences in SSU ribosomal molecular inventories in bioaerosols collected on five industrial composting sites during the turning of windrows in thermophilic phase . .	228
7.1	Characteristics of each compost windrow and meteorological conditions during air sampling	249
7.2	Quantitative real-time PCR systems	255
7.3	Background concentration of microorganisms in air	256
A.1	Phylogenetic positioning and sequences number for each bacterial phylotype. The table was ranked by decreasing number of sequences by phylotypes	306

Avant propos

Ce travail de thèse concernant les bioaérosols émis sur les plates-formes de compostage a bénéficié du soutien financier de l'ADEME et de la région Languedoc Roussillon. Il a été encadré par Jean-Jacques Godon (directeur de thèse) et par Nathalie Wéry (co-encadrante) au sein du laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement.

Par ailleurs, certains résultats s'intègrent dans un projet de recherche financé par l'ADEME et mené en collaboration avec un partenaire industriel, VEOLIA Environnement. Il s'agit du projet intitulé : "Etude des bioaérosols générés sur les sites de compostage, définition d'indicateurs d'exposition" (contrat n°0375C0033).

Introduction

En France, la production de déchets estimée en 2008 est de 47 millions de tonnes de matière brute par an (ADEME, 2008). Les déchets produits (eaux usées urbaines ou industrielles, ordures ménagères . . .) abritent des micro-organismes dont certains peuvent être pathogènes pour l’homme (Deportes et al., 1995). Lors des procédés de traitement des ces déchets, trois voies de dissémination des micro-organismes existent qui sont l’eau (rejet des effluents traités dans les milieux aquatiques), le sol (épandage des boues d’épuration, de compost, de lisier. . .) et l’air (émission de bioaérosol).

La dissémination dans l’air, via la formation de bioaérosol, régie notamment par les conditions météorologiques est peu documentée (Brooks et al., 2005b; Deloraine et al., 2002). Par la présence de micro-organismes pathogènes ou de certains composés métaboliques (endotoxines, mycotoxines, glucanes. . .), les bioaérosols émis sur les sites de traitement des déchets sont susceptibles d’avoir un impact sanitaire pour les travailleurs mais également pour les riverains proches des sites (Bunger et al., 2007; Herr et al., 2003; Porta et al., 2009).

Le compostage est en essor en France, du fait d’une interdiction de mise en décharge des déchets non ultimes et d’un renforcement des contraintes pour l’incinération. L’intérêt du compostage est que son produit, le compost, peut être valorisé et utilisé par les agriculteurs, les paysagistes. . . Une autre raison de cet essor est que le coût financier est inférieur à celui des autres filières de traitement. Rapidement le nombre de plates-formes de compostage a augmenté, et différents types de déchets sont aujourd’hui compostés. Néanmoins, des interrogations concernant ces installations à proximité des zones résidentielles apparaissent liées aux émissions d’odeurs et d’aérosols lors des activités. Actuellement, dans la réglementation française le risque microbiologique n’est pas pris en compte comme le sont le risque chimique ou les odeurs.

Sur les plates-formes de compostage, les principales activités génératrices de bioaérosols sont le retournement, le broyage et le criblage. Le taux d’émission est dépendant de la nature des produits compostés et aussi du procédé employé (Fracchia et al., 2006b). Après émission, de nombreux paramètres peuvent affecter la dispersion des bioaérosols : l’humidité, la température, le vent . . . (Taha et al., 2006). Au delà des risques biologiques liés au déchet lui-même, des développements importants de micro-organismes lors du procédé de compostage peuvent présenter un risque pour la santé (les actinomycètes, *Aspergillus fumigatus*). Ces micro-organismes sont également concentrés dans les bioaérosols de compostage. Malgré les risques sanitaires potentiels, il existe un manque de connaissance concernant la composition des bioaérosols émis sur les filières de traitement des déchets en général et lors du compostage en particulier.

Les objectifs de ce travail sont par la caractérisation de la diversité microbienne (bactérienne et fongique) aéroportée durant une phase émissive du procédé compostage, de concevoir des indicateurs biologiques spécifiques des bioaérosols de compostage et ainsi de déterminer la dispersion des bioaérosols autour des sites industriels. L’originalité de ces travaux a été d’utiliser les outils moléculaires qui permettent de pallier le fait qu’un

faible pourcentage de micro-organismes dans l'air sont cultivables (Amann et al., 1995; Peccia and Hernandez, 2006) et également le fait que les études ont été réalisées sur des sites de compostage industriels et non en laboratoire dans des réacteurs.

Ce travail a été réalisé sur différentes plates-formes de compostage traitant différents types de déchets selon des procédés différents, représentant le panel des plates-formes de compostage en France.

Cette étude a été réalisée sur une des étapes émissives de bioaérosols de compostage, qui est le retournement des andains en phase de fermentation. La phase de fermentation a été choisie d'une part parce qu'elle est associée au développement d'une flore spécifique, thermophile et susceptible de présenter des micro-organismes communs quelque soit le type de déchets compostés ou le procédé de compostage mis en place. D'autre part, les micro-organismes thermophiles peuvent présenter un faible niveau dans l'air, ce qui est intéressant pour la conception de traceurs.

Les travaux sont présentés de la manière suivante : tout d'abord la première partie est consacrée à une synthèse bibliographique présentant la microbiologie de l'air (les différentes sources, les mécanismes d'aérosolisation, la composition microbienne, les bioaérosols émis par les procédés de traitement des déchets, et la méthodologie pour les collecter et les analyser). Ensuite dans la seconde partie, les résultats obtenus sont présentés sous la forme de publications décrivant les étapes successives du travail.

- La description de la diversité microbienne des bioaérosols de compostage et la définition d'espèces communes ou "core species"
- Le développement d'indicateurs spécifiques des bioaérosols de compostage
- L'utilisation de ces indicateurs pour étudier la dispersion des bioaérosols de compostage

Enfin, la dernière partie est une discussion de l'ensemble des résultats, suivie d'une conclusion et des perspectives de ce travail.

Première partie

Contexte bibliographique

Introduction

Le contexte bibliographique est subdivisé en différents chapitres qui présentent la littérature associée aux bioaérosols présents dans l'atmosphère et les mécanismes d'aérosolisation.

Le premier chapitre a pour but de présenter les aérosols ainsi que les différentes sources répertoriées sur le globe. Quant au second chapitre, il est consacré à la composition microbienne présente dans l'atmosphère ainsi que les mécanismes de survie de ces derniers. Les impacts sanitaires pour l'homme associés à ces bioaérosols seront également évoqués.

Le troisième chapitre présente les bioaérosols qui sont générés au sein des procédés de dépollution et enfin le dernier chapitre récapitule les différentes techniques d'analyses pour caractériser les bioaérosols.

Les aérosols

Sommaire

1.1	Définition	30
1.2	Les sources des aérosols	30
1.2.1	Les sources naturelles	31
1.2.1.1	Les océans	31
1.2.1.2	La phyllosphère	32
1.2.1.3	Les régions désertiques	32
1.2.2	Les sources anthropiques	35
1.2.2.1	les activités agricoles	35
1.2.2.2	Le milieu urbain	38
1.2.2.3	Les industries	39
1.2.2.4	L'environnement intérieur	39
1.2.2.5	Les procédés de dépollution	40
1.3	Notion de bruit de fond dans l'air	41
1.4	Les mécanismes d'aérosolisation, de transport et de sédimentation	42
1.4.1	L'aérosolisation	42
1.4.1.1	Aérosolisation au sein de l'environnement aquatique	42
1.4.1.2	Aérosolisation au sein de l'environnement terrestre	44
1.4.1.3	Mesure du flux de micro-organismes émis	46
1.4.1.4	Mécanismes d'aérosolisation des champignons	48
1.4.2	Le transport dans l'air	49
1.4.2.1	La circulation atmosphérique	49
1.4.2.2	Forces exercées sur les particules aérosolisées	49
1.4.2.3	La taille des bioaérosols	51
1.4.3	La sédimentation	52
1.4.3.1	Le dépôt sec	52
1.4.3.2	Le dépôt humide	55

1.1 Définition

Un aérosol désigne tout ensemble de particules solides ou liquides, ou les deux, en suspension dans un milieu gazeux (norme NF X 43-001, 1982). Les particules sont conventionnellement considérées en suspension si leur vitesse de chute maximale est inférieure à 25 cm s^{-1} , dans un air immobile à une température de 20°C et à une pression de 101 kPa (INRS¹, ED984, 2008). Un aérosol désigne donc tout type de particules en suspension telles que fumées, poussières ou vésicules, et particules biologiques. Les aérosols peuvent être classés en deux catégories qui sont (Bourdin-korsakissok, 2009) :

- Les aérosols primaires correspondent aux particules s'aérosolisant
- Les aérosols secondaires sont formés à partir des composés présents dans l'atmosphère (formation de sulfate provenant de l'oxydation des gaz sulfurés par exemple.)

Les aérosols peuvent contenir des particules dont la taille varie de $0,02$ à $100 \mu\text{m}$ de diamètre. Au delà de cette taille, les particules se déposent rapidement par sédimentation (Pepper and Dowd, 2009) (figure 1.1).

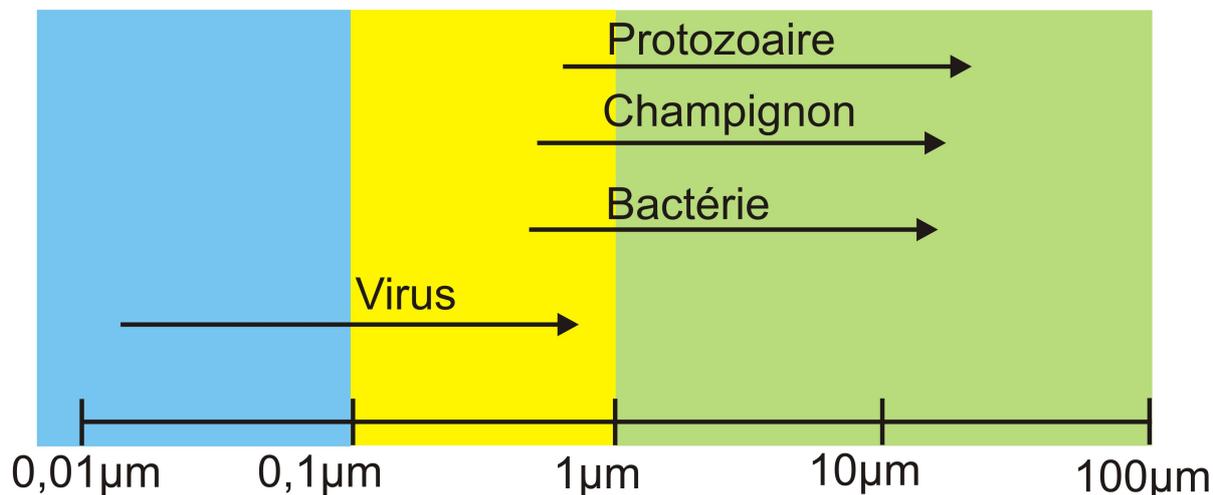


FIGURE 1.1 – Taille des micro-organismes présents dans les bioaérosols (Pepper and Dowd, 2009)

Le bioaérosol est la partie biologique d'un aérosol. Il s'agit de particules aéroportées constituées d'organismes vivants (bactéries, champignons, virus...) ou des composés cellulaires microbiens comme les endotoxines, provenant des bactéries Gram négatif, les glucanes (actinomycètes et champignons) ou des débris de parois cellulaires (Fracchia et al., 2006b; Peccia and Hernandez, 2006).

1.2 Les sources des aérosols

Plusieurs millions de tonnes d'aérosols sont émis chaque jour à l'échelle planétaire par différentes sources qui peuvent être naturelles telles que les cendres volcaniques, les

1. Institut National de la Recherche et de Sécurité

poussières désertiques, les embruns marins, mais peuvent également provenir des activités anthropiques (fumées d'industries, particules issues de la combustion des énergies fossiles, de la déforestation, des incendies...) d'où une grande diversité dans la composition des aérosols.

Les aérosols en suspension dans l'air se dispersent dans la troposphère et aussi dans la stratosphère². Ils sont plus abondants au sein de la troposphère que dans la stratosphère. Leur temps de séjour au sein de l'atmosphère est variable mais il est en moyenne compris entre 2 et 15 jours (Burrows et al., 2009a). Ce temps de séjour est soumis à différents facteurs comme les sources d'émissions, la taille des particules, les conditions météorologiques...

1.2.1 Les sources naturelles

Cette catégorie rassemble les émissions d'aérosols émis naturellement. Le planisphère indique la répartition des principaux biomes (figure 1.2). Un biome est défini comme un ensemble d'écosystèmes caractéristique d'une aire biogéographique contrôlée par le climat. Le taux d'émission des bioaérosols dans l'air chaque année est estimé à 1×10^9 t (tonnes)³ (Jaenicke, 2005). Les différentes parties ci-dessous représentent les principales sources d'émissions, classées selon leur superficie.

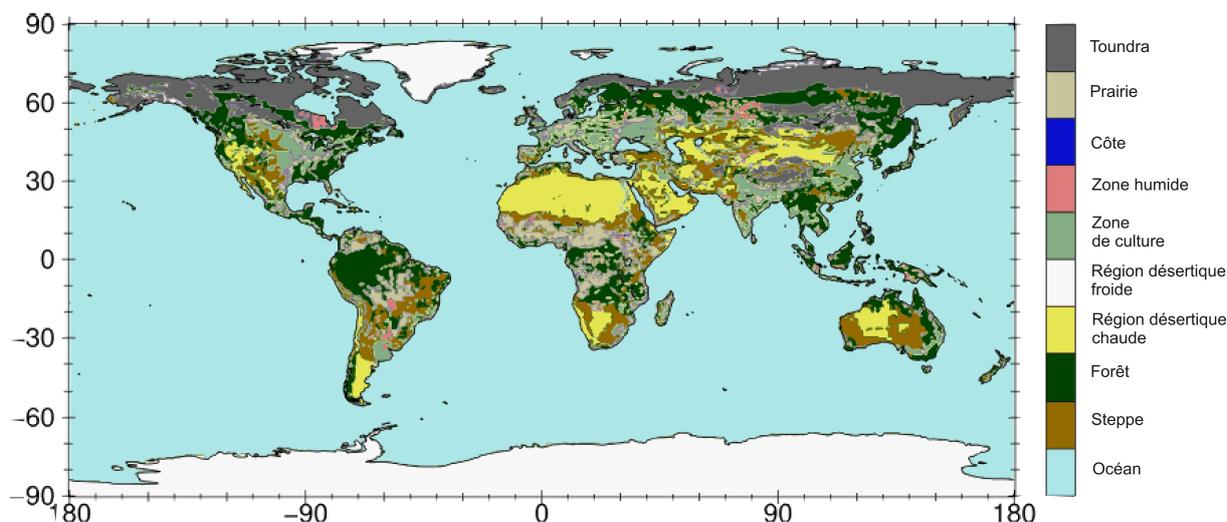


FIGURE 1.2 – Planisphère représentant les principaux biomes (Burrows et al., 2009a)

1.2.1.1 Les océans

la surface des océans occupe 74%, soit 363×10^6 km² de la surface du globe (estimée à 510×10^6 km²). Les aérosols marins sont la principale source naturelle d'émission. Les

2. L'atmosphère est divisée en différentes couches, les limites ont été fixées selon la température et l'altitude. La troposphère est comprise entre la surface terrestre et une altitude de 15 km. La température est comprise entre 20°C et -50°C. La stratosphère est la seconde couche de l'atmosphère se situant au-dessus de la troposphère. Elle s'étend jusqu'à 50 km d'altitude, la température y varie de -50°C à 0°C. Cette couche contient la couche d'ozone.

3. Toutes les valeurs supérieures ou égales à 1000 seront exprimées en écriture scientifique (1×10^3)

aérosols primaires (composés organiques et inorganiques, principalement le sel) sont émis par le mouvement de l'eau. L'abondance des bactéries à la surface de l'eau est estimée entre 1×10^5 et 1×10^7 cellules cm^{-3} (Cho and Azam, 1990; Li et al., 2004; Kilham, 1981). Whitman *et al.* ont estimé le nombre de procaryotes présents dans le milieu aquatique (somme des micro-organismes estimés au sein des océans, des lacs et des rivières) à 12×10^{28} cellules (Whitman et al., 1998).

Bien que la superficie des océans soit la plus élevée par rapport à la surface terrestre, les océans ne constituent pas la source principale de bioaérosol. Elbert *et al.* ont estimé l'émission de spores fongiques en se basant sur le taux de sel émis dans l'atmosphère et en estimant qu'il y avait entre 100 et 1×10^3 cellules par litre d'eau de mer (Elbert et al., 2007). Il en ressort que le taux d'émission annuel est de 1×10^7 t. Au niveau des régions côtières, la concentration des bactéries est comprise entre $2,9 \times 10^3$ et $1,4 \times 10^4$ cellules cm^{-3} d'après un comptage microscopique précédé d'une hybridation (Harrison et al., 2005).

Après avoir vu les océans, passons aux terres émergées. Elles ont une surface de 134×10^6 km^2 . Le flux d'émission des spores de champignons est de l'ordre de $200 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ et le taux d'émission est de 5×10^7 t par an (Elbert et al., 2007). On observe qu'il y a un facteur cinq entre le taux émis par la surface terrestre et les océans. Le nombre de procaryotes estimé dans le sol (somme des micro-organismes estimée au sein des différents types de sol de part le globe) est de 26×10^{28} cellules (Whitman et al., 1998).

1.2.1.2 La phyllosphère

La phyllosphère correspond à la surface des feuilles et aux parties aériennes des végétaux, sa surface est d'environ $6,4 \times 10^8$ km^2 (Lindow and Brandl, 2003).

La concentration de micro-organismes, majoritairement des bactéries, sur les feuilles est comprise entre 1×10^6 et 1×10^7 cellules cm^{-2} de feuille ou 1×10^8 cellules g^{-1} de feuille (Lindow and Brandl, 2003). La population microbienne au sein de la phyllosphère a été estimée à 1×10^{26} cellules par (Morris and Kinkel., 2002). La surface des forêts représente environ 30% des terres émergées (40×10^6 km^2).

Plusieurs études ont cherché à estimer la concentration de bactéries pouvant s'aérosoliser dans des zones arbustives. La concentration bactérienne présente près de la surface des feuilles varie entre $1,2 \times 10^4$ et $8,4 \times 10^5$ m^{-3} (Shaffer and Lighthart, 1997; Tilley and Ho, 2001; Tong and Lighthart, 1997).

1.2.1.3 Les régions désertiques

La superficie de ces régions est de l'ordre de 35×10^6 km^2 ce qui représente environ 26% des terres émergées. Les déserts sont définis comme ayant une précipitation annuelle inférieure à 100 mm. Les régions désertiques peuvent être classées en deux catégories :

- Les régions chaudes

– Les régions froides

1.2.1.3.1 Les régions désertiques chaudes

La superficie des régions désertiques chaudes est estimée à environ 19×10^6 km². Il s'agit de la principale source d'émission d'aérosols vers l'atmosphère, car elle représente 40% des émissions totales (Mokhtari, 2010).

Les déserts émettent une grande quantité d'aérosols chaque année dans l'atmosphère : $2,2 \times 10^9$ t. C'est la première source mondiale d'émission des aérosols. Le dépôt des aérosols désertiques peut être une source très importante d'approvisionnement en certains éléments clés, comme le fer ou le phosphore pour certaines zones du globe. C'est le cas de la forêt amazonienne (Swap et al., 1992), des eaux de surface méditerranéennes en été, mais aussi des écosystèmes marins éloignés où les apports de fer biodisponibles via les aérosols désertiques permettraient le développement du phytoplancton, augmentant ainsi la séquestration de quantité importante de dioxyde de carbone (Mokhtari, 2010; Jickells et al., 2005).

Prospero *et al.* ont montré que plus de la moitié des particules présentes dans l'atmosphère de Floride ont une origine africaine (Prospero, 1999). Les nuages de poussières émis des déserts transportent également des micro-organismes, un gramme de poussière de désert pouvant contenir jusqu'à 1×10^9 cellules (Whitman et al., 1998). Les poussières émises dans l'atmosphère par les déserts en Afrique mettent généralement trois à cinq jours pour traverser l'océan Atlantique et atteindre les côtes de Floride distantes de 6×10^3 km tandis que celles émises par les déserts en Asie traversent l'océan Pacifique en sept à neuf jours (Griffin et al., 2007). La concentration bactérienne au sein des aérosols émis par les déserts est comprise entre 160 et $3,8 \times 10^4$ m⁻³ (Lighthart and Shaffer, 1994). La figure 1.3 représente la carte des émissions des aérosols ayant une origine désertique.

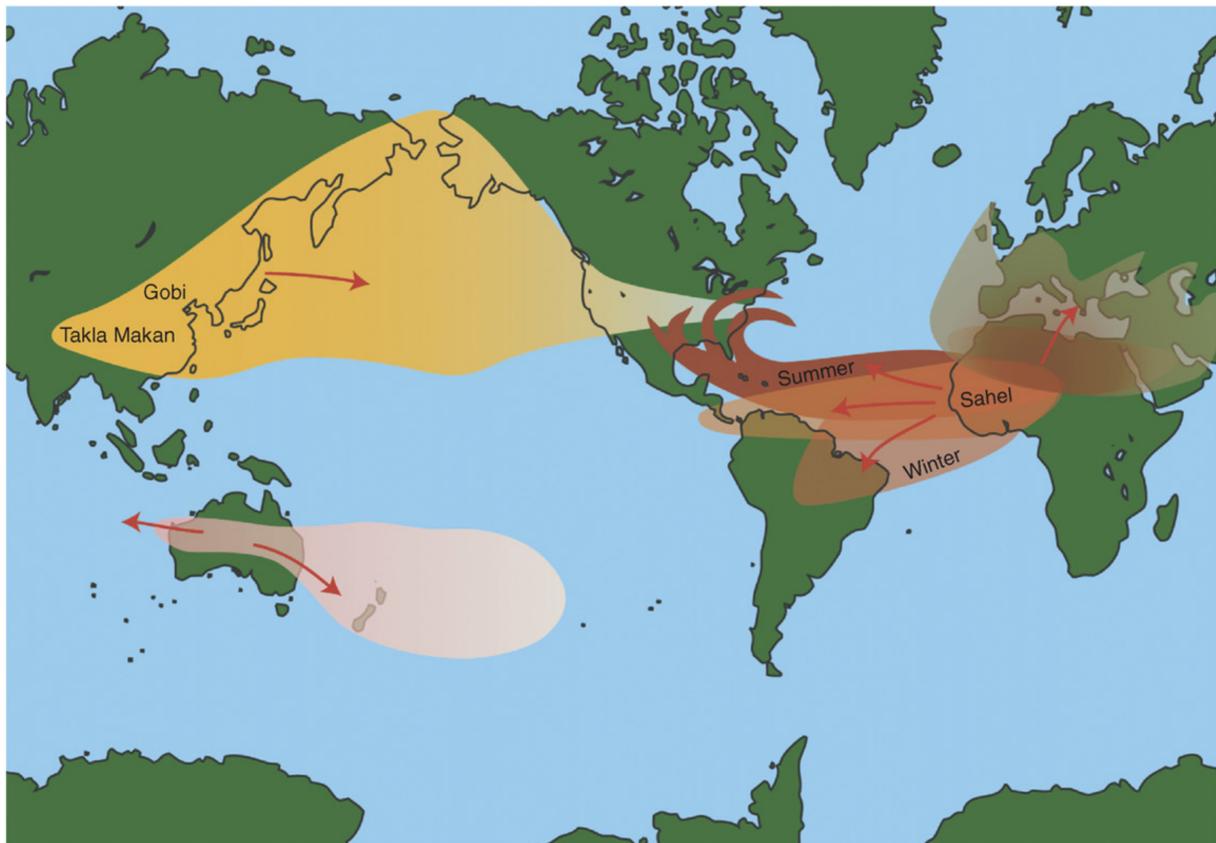


FIGURE 1.3 – Planisphère présentant les trajectoires des principaux aérosols émis par les déserts (Kellogg and Griffin, 2006)

1.2.1.3.2 Les régions désertiques froides

La superficie des régions désertiques froides est de $16 \times 10^6 \text{ km}^2$. Les régions froides sont les régions polaires (Antarctique et Arctique), les glaciers y sont également incorporés. Au pôle Sud, la concentration microbienne au niveau de la couche neigeuse est comprise entre 200 et $5 \times 10^3 \text{ cellules mL}^{-1}$. Pady *et al.* ont montré que l'air polaire à Montréal est moins concentré en bactéries et champignons que d'autres masses d'air (Pady and Kelly, 1954). Il n'y a eu que peu d'études réalisées au sein de ces régions. Citons celle de Bauer *et al.* effectuée en Antarctique (Bauer et al., 2002). Dans cette étude, la concentration moyenne des bactéries dans les nuages est estimée à $5,9 \times 10^3 \text{ cellules m}^{-3}$ tandis que la concentration des spores fongiques est de $2,2 \times 10^3 \text{ spores m}^{-3}$. Le comptage a été effectué par épifluorescence. L'effet de la neige sur l'aérosolisation est peu connu. Mais le fait d'avoir une couche neigeuse recouvrant le sol, les végétaux... peut efficacement empêcher l'émission dans l'atmosphère (Li et al., 2004).

Concernant l'émission de bioaérosols au niveau des différentes sources naturelles présentes sur la Terre, les océans n'en sont pas la principale source. La première source d'émission sont les déserts, les océans se classent en quatrième position (Matthias-Maser and Jaenicke, 1995). Après avoir traité les sources naturelles, la seconde partie abordera les sources anthropiques génératrices d'aérosols. Elles sont moins importantes que les sources naturelles en terme d'émission mais elles peuvent avoir un impact sur la santé humaine (pollution, risques sanitaires...).

1.2.2 Les sources anthropiques

les activités humaines générant des aérosols peuvent être classées en deux catégories : les activités agricoles et les activités industrielles (comprenant le milieu urbain).

1.2.2.1 les activités agricoles

La surface cultivable mondiale est estimée à $15,5 \times 10^6$ km². Ces terres contiennent environ 49×10^{27} procaryotes (Whitman et al., 1998). Les activités comme la préparation de la terre (labourage, hersage), la récolte des cultures (moissons, ensilages) génèrent des aérosols. Il n'y a pas que les activités mécaniques qui émettent des aérosols, les conditions météorologiques jouent aussi un rôle. Le vent permet l'aérosolisation des micro-organismes et des spores présents à la surface des cultures.

Harrison *et al.* ont montré que la concentration des micro-organismes présents dans l'air de deux environnements ruraux en Angleterre varie entre 4×10^3 et $1,5 \times 10^4$ m⁻³ (Harrison et al., 2005). Plusieurs études rapportent une concentration bactérienne dans différents environnements agricoles comprise dans une gamme allant de 100 à 1×10^3 UFC m⁻³ (Bovallius et al., 1978; Lighthart, 1997; Shaffer and Lighthart, 1997). Le tableau 1.1 indique la concentration des micro-organismes mesurée dans l'air par différents auteurs, avec différentes techniques.

TABLEAU 1.1 – Concentrations des bactéries aérosolisées dans différents environnements agricoles (Burrows et al., 2009b)

Culture	Sources	Méthodes ¹	Bactéries totales ou UFC ² m ⁻³	Références
Culture	Haricots	I-C n ³ =5	moy ⁴ $2,2 \times 10^3$	(Lindemann et al., 1982)
	Luzerne	I-C n=5	moy $2,7 \times 10^3$	(Lindemann et al., 1982)
	Blé d'hiver	I-C n=4	moy $6,5 \times 10^3$	(Lindemann et al., 1982)
	Mais	I-C n=3	moy 140	(Lindemann et al., 1982)
Herbe	Herbe	F-M n=3	moy $8,5 \times 10^4$	(Tong and Lighthart, 1997)
	Balle	I-C n=1	280	(Shaffer and Lighthart, 1997)
	Ensilage	C n=nd ⁵	min ⁶ 5×10^4 à max ⁶ 5×10^5	Eduard, 1997
		I-C n=1	140	(Shaffer and Lighthart, 1997)
Air campagne	Pershire (Ang) ⁷	F-M n=105-111	totales minmoy ⁸ 4×10^3 maxmoy ⁸ $1,5 \times 10^4$	(Harrison et al., 2005)
	Lichfield (Ang)	F-M n=105-111	totales minmoy 8×10^3 maxmoy $1,6 \times 10^4$	(Harrison et al., 2005)
	Argentine (Ang)	I-C n=3	mingeo ⁹ 1×10^3 à maxgeo ⁹ 3×10^3	(Negrin et al., 2007)
Récolte	Blé	C n=nd	min ⁶ 5×10^7 max ⁶ 5×10^8	(Batel et al. 1979))

¹ Méthodes employées pour la collecte des aérosols (F filtration, I impaction)

¹ Méthodes employées pour le dénombrement des micro-organismes (C culture et M microscopie)

² Par défaut la concentration est exprimée en UFC, si le dénombrement est total, ceci est indiqué

³ Nombre d'échantillon; ⁴ moyenne; ⁵ non déterminé; ⁶ minimum, maximum; ⁷ Angleterre

⁸ Moyenne des valeurs minimales et maximales; ⁹ moyenne géométrique des valeurs minimales et maximales

D'autres activités agricoles génèrent aussi des aérosols comme l'élevage qui peut être effectué en hors-sol. Le tableau 1.2 issu de Gilbert et Duchaine rassemble les concentrations bactériennes et fongiques mesurées (Gilbert and Duchaine, 2009). Au sein des porcheries la concentration est comprise entre 1×10^3 et 1×10^8 bactéries totales m^{-3} . La concentration fongique est de l'ordre de $100 - 1 \times 10^3$ UFC m^{-3} Palmgren *et al.* ont dénombré par microscopie $3,1 \times 10^7$ micro-organismes m^{-3} (Palmgren et al., 1986).

TABLEAU 1.2 – Les différentes activités agricoles générant des bioaérosols (Gilbert and Duchaine, 2009)

Environnement agricole	Concentration en UFC m^{-3}		Références
	Bactéries	Champignons	
Porcherie	1×10^3 à 1×10^8	100 à 1×10^3	Chang et al., 2001; Cormier et al., 1990 Donaldson et Alexandersen, 2002 Donaldson et al., 1983 Duchaine et al., 2000; Lee et al., 2006 Nehme et al., 2008; Seedorf et al., 1998
Bovins engraissement	100 à 1×10^4	$1 - 10$	Donaldson et Alexandersen 2002 Donaldson et al., 1983 Mars et al., 1999; Seedorf et al., 1998 Wilson et al., 2002
Fermes laitières	1×10^4 à 1×10^5	1×10^3 à 1×10^7	Donaldson et Alexandersen, 2002 Donaldson et al., 1983 Duchaine et al., 1999; Lee et al., 2006 Mars et al., 1999; Matkovic et al., 2006 Seedorf et al., 1998; Zeng et al., 2004
Poulaillers	1×10^5 à 1×10^8	1×10^4	Alexander et al., 2004; Endley et al., 2001 Lee et al., 2006; Oppliger et al., 2008
Récolte du grain	1×10^4 à 1×10^6	1×10^3 à 1×10^6	Dutkiewicz, 1986; Dutkiewicz et al., 2000 Krysinska-Traczyk et Dutkiewicz, 2000 Lee et al., 2006; Swan et Crook, 1998
Silo maïs	1×10^3 à 1×10^6	1×10^6 à 1×10^9	Dutkiewicz et al., 1989

1.2.2.2 Le milieu urbain

L'émission des aérosols dans les villes a lieu en différentes sources (jardins, parcs, industries. . .). Dans les villes, les hommes sont présents en forte densité, une des principales sources microbiennes est liée à la microflore aérosolisée de l'homme (peaux, muqueuses. . .).

Le tableau 1.3 présente les concentrations bactériennes mesurées, par différentes études et techniques, dans plusieurs airs urbains.

TABLEAU 1.3 – Concentration bactérienne aérosolisée dans l'air urbain (Burrows et al., 2009a)

Sources	Méthodes ¹	Bactéries totales ou UFC ² m ⁻³	Références
Moscou	I-C	810	Vlodavets et Mats (1958)
Montréal	I-C	790	Kelly et Pady (1954)
Paris (parc)	I-C	290	Gregory (1971)
Suède (parc)	I-C	760	Bovallius et al. (1978)
Buenos Aires	I-C	640 à 2×10^3	Negrin et al. (2007)
Marseille	I-C	790	di Giorgio et al. (1996)
Mexico	I-C	150	Rosas et al. (1994)
Pologne	I-C	80-660	Pastuszka et al. (2000)
Birmingham	F-M	total minmoy ³ $3,3 \times 10^3$ à maxmoy ³ $1,7 \times 10^4$	Harrison et al., (2005)
Arabie Saoudite	I-C	100 à 2×10^3	Mahdy et El-Sehrawi (1997)
Pékin			
–Centre de recherche	I-C	$2,8 \times 10^3$	Fang et al. (2007)
–Jardin botanique	I-C	$1,5 \times 10^3$	Fang et al. (2007)

¹ Méthodes employées pour la collecte des aérosols (F filtration, I impaction)

¹ Méthodes employées pour le dénombrement des micro-organismes (C culture et M microscopie)

² Par défaut la concentration est exprimée en UFC, si le dénombrement est total, ceci est indiqué

³ Moyenne minimale et maximale

1.2.2.3 Les industries

Les usines sidérurgiques (Gorny et al., 2004), les scieries (Duchaine and Meriaux, 2000; Oppliger, 2005), l'industrie du tabac (Reiman and Uitti, 2000), les abattoirs (Jericho and Kozub, 2000) sont des sources d'émissions de bioaérosols. Les concentrations en micro-organismes cultivables de ces différents environnements varient entre 10 et 1×10^5 UFC m^{-3} .

Le tableau 1.4 indique les concentrations bactériennes et fongiques au sein des bioaérosols prélevés dans plusieurs environnements industriels (Gilbert and Duchaine, 2009).

TABLEAU 1.4 – Industries générant des bioaérosols (Gilbert and Duchaine, 2009)

Industries	Concentration en UFC m^{-3}		Références
	Bactéries	Champignons	
Crèmerie	1×10^4	1×10^6	Duchaine and Meriaux, 2000 Duchaine et al., 2000 Dutkiewicz et al., 2001
Scieries	1×10^3 à 1×10^4	1×10^3 à 1×10^4	Dutkiewicz et al., 2001
Fabrique de meubles	100 à 1×10^4	100 à 1×10^4	Krysinska-Traczyk et al., 2002
Menuiserie	100	1×10^3	Veillette et al., 2006
Aciéries	10 à 100		Gorny et al. 2004
Textiles	1×10^5	1×10^4	Krysinska-Traczyk et al., 2002

1.2.2.4 L'environnement intérieur

Les environnements intérieurs tels que les habitations, les hôpitaux, les écoles... sont également des sources d'émissions des aérosols. L'homme passe entre 70 et 90% de son temps dans des environnements clos (Simon et al., 2007). Dans cet environnement la pollution aussi bien chimique (monoxyde de carbone, oxyde d'azote, fumées, peintures...) que biologique (bactéries, champignons, endotoxines, acariens...) est plus concentrée que dans l'environnement extérieur. La pollution de l'air rencontrée dans les environnements intérieurs peut provenir du sol, des murs, des systèmes d'air conditionné, des activités humaines, du mobilier...

Dans leur étude Lee *et al.* portant sur les spores de champignons dans l'air intérieur de six maisons, ils ont montré que la concentration est sensiblement identique entre l'intérieur et l'extérieur (Lee et al., 2006). Wu *et al.* montrent également des résultats similaires $9,1 \times 10^3$ (hiver) et $3,6 \times 10^3$ (été) UFC m^{-3} dans des habitations urbaines tandis que la concentration extérieure est de $11,8 \times 10^3$ (hiver) et $4,1 \times 10^3$ (été) UFC m^{-3} (Wu et al., 2000). Des concentrations de micro-organismes ont été mesurées dans des bureaux (Luoma and Batterman, 2001) et dans des écoles (Godwin and Batterman, 2007; Scheff et al., 2000). La concentration bactérienne est comprise entre 140 et 230 UFC m^{-3} tandis que la concentration fongique s'étend entre 60 et 110 UFC m^{-3} dans les bureaux (Luoma and Batterman, 2001). Dans les écoles la concentration moyenne fongique est de 500 UFC m^{-3} , les genres *Aspergillus*–*Penicillium* sont dominants (Godwin and Batterman, 2007).

Dans les hôpitaux ont été détectés des virus (Aintablian and Sawyer, 1998; McCluskey and Greene, 1996; Sawyer and Wallace, 1994) et de nombreux micro-organismes pathogènes pouvant être responsables de maladies nosocomiales (Aintablian and Sawyer, 1998; Angenent et al., 2005; Bartlett, 1997; Vadrot et al., 2004).

1.2.2.5 Les procédés de dépollution

Les principales filières de traitement de dépollution émettant des aérosols sont :

- Les centres de stockage des déchets ultimes,
- Les stations d'épurations,
- Les digesteurs anaérobie,
- L'épandage,
- Le compostage

Ces procédés seront détaillés dans le chapitre 3.

Au cours de cette section, les différents types de sources d'émissions des bioaérosols (naturelles et anthropiques) ont été présentés. Mais, d'autres composés peuvent être émis par ces deux types de sources, ils sont répertoriés dans le tableau 1.5 (Minivielle-Moncia, 2003). D'après ce tableau, les sources naturelles émettent 30 fois plus que les sources anthropiques. Les poussières minérales sont les composés les plus émis confortant ainsi la principale source d'émission que sont les déserts. La concentration de l'homme dans les environnements intérieurs et dans les villes a une influence sur la microbiologie de l'air.

TABLEAU 1.5 – Les différents composés émis dans l'atmosphère classés selon leur origine (Minivielle-Moncia, 2003)

Source	Concentration émise vers l'atmosphère en tonne an ⁻¹
Naturelle	
Poussières minérales	$1,5 \times 10^9$
Sels de mer	$1,3 \times 10^9$
Poussières volcaniques	$3,3 \times 10^7$
Composés biologiques	5×10^7
Total	3×10^9
Anthropique	
Poussières industrielles	1×10^8
Carbone (énergie fossile)	8×10^6
Carbone (énergie biomasse)	5×10^6
Total	1×10^8

1.3 Notion de bruit de fond dans l'air

Le bruit de fond de l'air peut être caractérisé comme étant la concentration en micro-organismes présente dans l'air sans être sous influence d'une source industrielle. Généralement, les concentrations microbiennes sont aux alentours de 100 UFC m⁻³ aussi bien pour les bactéries que pour les champignons (Bunger et al., 2000b; Delaunay, 1997; Hours, 2003). Pour Hryhorczuk *et al.*, qui ont étudié le bruit de fond de l'air sur une cinquantaine de points de prélèvement, ils obtiennent un bruit de fond pour les bactéries et les champignons de l'ordre de 1×10^3 UFC m⁻³ (Hryhorczuk et al., 2001). La concentration microbienne au sein du bruit de fond de l'air est dépendante des conditions environnementales (température, humidité...). Dans une zone résidentielle non soumise aux activités de compostage, la concentration d'*Aspergillus fumigatus* est en moyenne de 27 UFC m⁻³ et pour les actinomycètes thermophiles, elle est de 45 UFC m⁻³ (Recer et al., 2001). La concentration d'*Aspergillus fumigatus* mesurée par Recer *et al.* est similaire à celle obtenue par O'Gorman *et al.* sur quatre sites environnementaux (inférieure à 40 UFC m⁻³) (OGorman and Fuller, 2008).

1.4 Les mécanismes d'aérosolisation, de transport et de sédimentation

Les particules de l'aérosol vont subir différentes phases successives qui sont :

- l'aérosolisation
- le transport
- et la sédimentation

Les mécanismes qui régissent ces différentes phases seront présentés dans les paragraphes suivants. Tout d'abord commençons par la phase d'aérosolisation.

1.4.1 L'aérosolisation

Lors de la phase de décollage, le mécanisme d'aérosolisation diffère selon que la source d'émission soit solide ou liquide. Ce transfert, vers la phase gazeuse, est lié à différents facteurs physiques générant l'aérosolisation (vent, agitation mécanique, mouvement des vagues, production de gaz générant des bulles...).

1.4.1.1 Aérosolisation au sein de l'environnement aquatique

Le principal mécanisme d'aérosolisation au sein de l'environnement aquatique peut être comparé à un spray. En effet l'aérosolisation est possible, lorsque l'eau est en mouvement (vagues) et par le vent.

Les vagues couplées au vent permettent la formation d'embruns et ainsi le décollage des micro-organismes marins. Lors de précipitation, les gouttes de pluie tombent à la surface de l'eau et créent de petites gouttes qui s'aérosolisent (Modini et al., 2010). Les bulles produites remontent à la surface et éclatent induisant deux phénomènes d'aérosolisation : les "jet drops" et les "film drops". Les "film drops" ont une taille comprise entre 0,1 et une dizaine de micromètres (Blanchard and Syzdek, 1982) (figure 1.4).

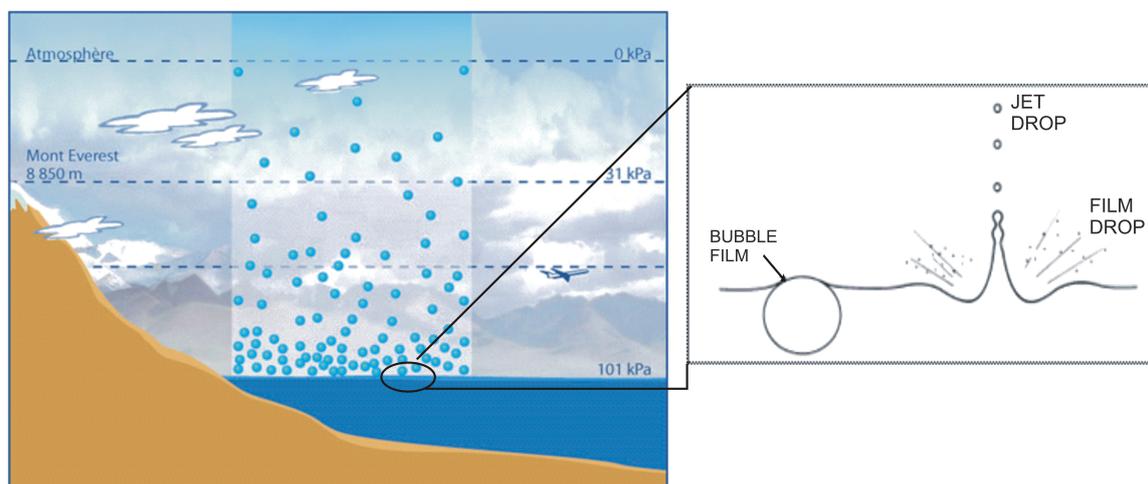


FIGURE 1.4 – Aérosolisation dans les environnements aquatiques (Blanchard and Syzdek, 1982)

Le vent joue un rôle dans l'aérosolisation, sa vitesse doit être supérieure à 5 m s^{-1} pour que l'aérosolisation s'effectue (Lewis and E., 2004). Le vent est considéré par de nombreux auteurs (Bovallius et al., 1978; Lighthart et al., 2004; Mouli et al., 2005) comme ayant une corrélation positive avec la concentration bactérienne aérosolisée. De plus Aller *et al.* ont observé la formation de gouttelettes s'aérosolisant lors du déplacement des bateaux (Aller et al., 2005).

Le diamètre des bulles formées est compris entre $20 \mu\text{m}$ et 1 cm dont la majeure partie a une taille de $100 \mu\text{m}$. Aller *et al.* ont montré qu'il y a huit fois plus de bactéries présentes dans un aérosol marin (16×10^6 cellules mL^{-1}) qu'à la surface de l'eau (2×10^6 cellules mL^{-1}) (Aller et al., 2005). Blanchard *et al.*, Syzdek *et al.* et Burger *et al.* obtiennent des résultats similaires à ceux d'Aller *et al.* (Aller et al., 2005; Blanchard and Syzdek, 1982; Burger and Bennett, 1985; Syzdek, 1985).

Quelques études ont cherché à quantifier le nombre de cellules pouvant s'aérosoliser lors de la formation de gouttelettes. Le tableau 1.6 recense les résultats obtenus exprimés en facteur de concentration (CF). Le facteur de concentration est le rapport entre la concentration microbienne mesurée dans les gouttelettes produites et la concentration microbienne présente dans le liquide qui en est à l'origine. Quand le rapport CF est supérieur à 1 cela signifie qu'il y a plus de micro-organismes sur les gouttelettes qui s'aérosolisent que dans le milieu, et quand CF est inférieur à 1 il y a moins de micro-organismes dans les gouttelettes que dans le milieu. Enfin quand CF est égale à 1 il y a autant de micro-organismes dans les deux environnements.

TABLEAU 1.6 – Quantification de l'aérosolisation d'après le facteur de concentration

Espèces	Facteur de Concentration (CF) ¹	Aérosolisation	Références
<i>Serratia marcescens</i>	10–20	oui	(Blanchard <i>et al.</i> , 1982)
<i>Serratia marcescens</i> (non pigmenté)	0,2–0,62	non	(Burger <i>et al.</i> , 1985)
<i>Serratia marcescens</i> (pigmenté)	3–14	oui	

¹ le rapport entre la concentration microbienne mesurée dans les gouttelettes produites et la concentration microbienne présente dans le liquide qui en est à l'origine

Hejkal *et al.* ont montré que plusieurs paramètres pouvaient influencer le facteur de concentration. La composition lipidique des parois cellulaires a un effet sur ce facteur, en effet ils sont hydrophobes et donc certaines bactéries se retrouvent à la surface. La taille des bulles a une influence sur l'aérosolisation des micro-organismes (facteur de concentra-

tion optimum dans la gamme 35-45 μm). Le fait d'être en culture mixte influe également sur le facteur de concentration de certaines espèces (augmentation 3 à 11 fois celui de *Serratia marinorubra*). L'âge de la culture a également un effet positif sur le facteur de concentration observé chez *Escherichia coli*, ceci pourrait indiquer que le changement cellulaire peut avoir une incidence sur la concentration de l'aérosol (Hejkal, 1980). Burger *et al.* ont montré que la souche *Serratia marcescens* possédant la prodigiosine, pigment rouge insoluble dans l'eau et fixé à la membrane, s'aérosolise plus facilement qu'une souche de *Serratia marcescens* dépourvue de pigment (Burger and Bennett, 1985).

1.4.1.2 Aérosolisation au sein de l'environnement terrestre

Un aérosol terrigène est généré par l'érosion des sols. L'émission est dépendante de plusieurs facteurs comme la vitesse du vent, la présence d'un couvert végétal ou non, de l'humidité du sol et également de la texture du sol. La première cause d'érosion est le vent, on parle alors d'érosion éolienne, courante dans les déserts. Lorsque la vitesse du vent est supérieure à $0,2 \text{ m s}^{-1}$, des particules ayant un diamètre de $75 \mu\text{m}$ commencent à s'aérosoliser (Grini *et al.*, 2002).

Les deux mécanismes permettant l'aérosolisation des particules terrestres sont la saltation et la suspension (figure 1.5).

- La saltation permet de transporter des particules selon un flux horizontal. Elles se déplacent par sauts tout en étant entraînées par le vent puis retombent au sol sous l'action de la pesanteur. La longueur d'un saut de particules est de l'ordre du mètre pour une vitesse de vent de l'ordre de 5 m s^{-1} à 10 cm du sol (Bouزيد, 2005). 90% des particules ont des sauts inférieurs à 30 cm (FAO, 1988). Néanmoins ce mécanisme est nécessaire pour débiter l'érosion éolienne.
- La suspension s'applique aux petites particules, dont le diamètre est inférieur à $70 \mu\text{m}$ (limons, sables fins). Ce type de particule est aérosolisée grâce au phénomène de saltation.

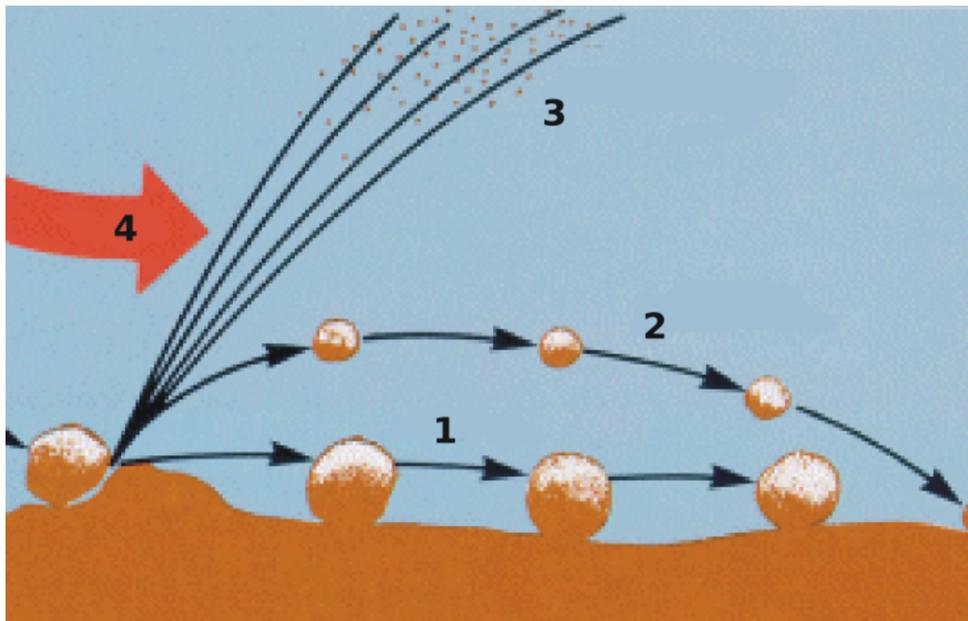


FIGURE 1.5 – Aérosolisation à partir du sol dans les environnements terrestres (source wikipédia) 1 : reptation – 2 : saltation – 3 : suspension – 4 : vent

Le Diagramme de Hjulström permet de connaître l'activité d'une particule en fonction de la vitesse et de sa taille. C'est à dire qu'il est possible de prévoir pour une particule d'une taille donnée et selon une vitesse du vent définie, de savoir s'il y aura transport (aérosolisation), érosion (saltation), ou dépose (sédimentation) (figure 1.6). Plus les particules sont grosses plus la vitesse doit être importante pour les maintenir en l'air. Ce diagramme est à la base prévu pour les cours d'eau mais le principe s'applique également au transport par le vent sauf que la vitesse du vent doit être plus élevée que celle de l'eau pour déplacer les particules de la même taille (présence de forces de frottement dans l'air).

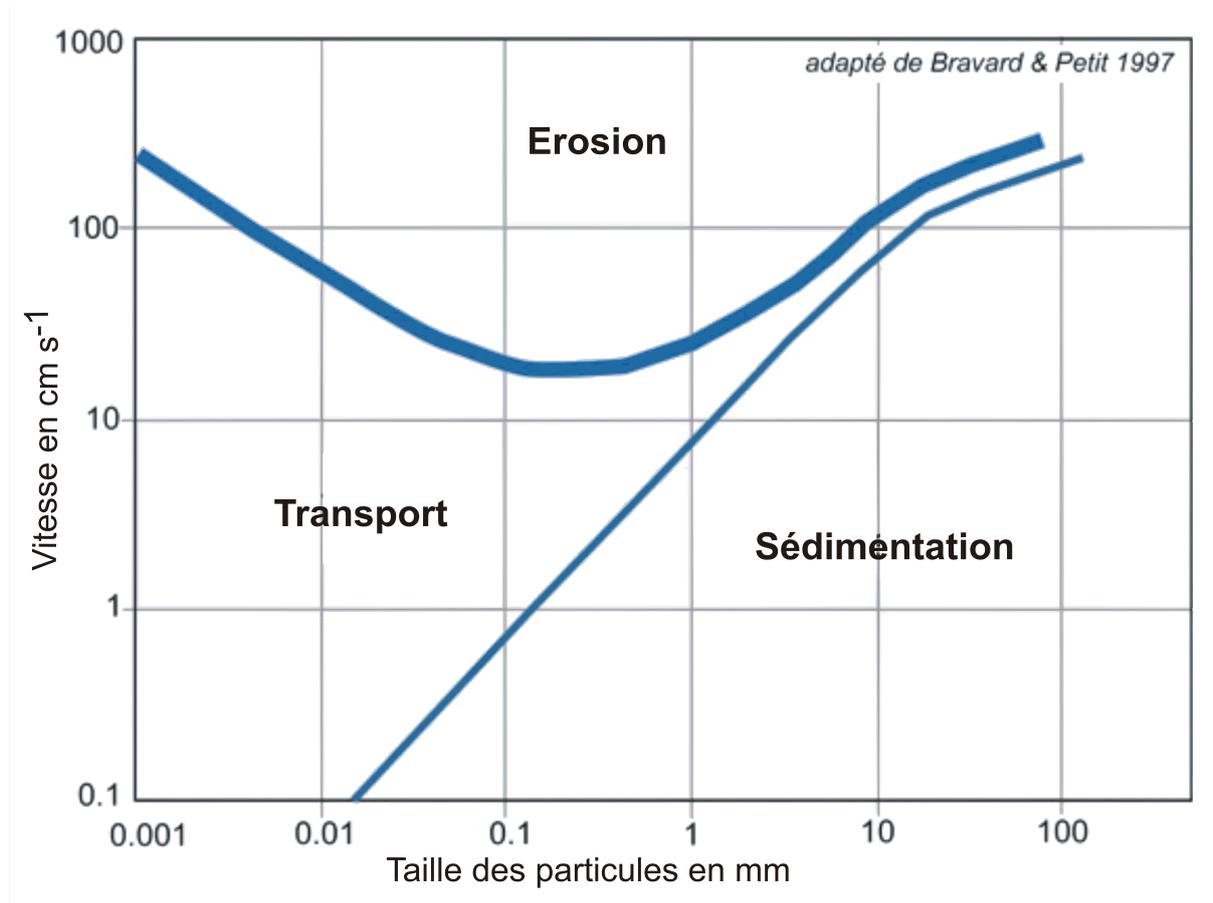


FIGURE 1.6 – Diagramme de Hjulström permettant de connaître l'activité d'une particule en fonction de sa taille et de la vitesse du vent

1.4.1.3 Mesure du flux de micro-organismes émis

Il existe peu de publications sur la mesure de flux. Les flux tiennent compte des données météorologiques locales ainsi que des mesures de concentration des micro-organismes. La mesure est obtenue par la dépose des micro-organismes sur des boîtes de Pétri exposées horizontalement séparées par une hauteur connue. Deux formules permettent de dénombrer le flux des micro-organismes exprimé en UFC m⁻² s⁻¹ :

- La méthode des gradients (Lindemann et al., 1982)

$$F = -0,16\rho \times \Delta zu \Delta u / [\ln(z2/z1)]^2 \times \Delta[bact] / \Delta zc$$

ρ : densité de l'air

Δu : différence entre les vitesses du vent enregistrées par deux anémomètres séparés par une hauteur $\Delta zu = (z2 - z1)$

$z2$ et $z1$: hauteur des deux collecteurs ainsi que des anémomètres. $\Delta[bact]$: différence de concentration aérienne en bactéries mesurées par des échantillonneurs séparés par une hauteur Δzc

- Le ratio de Bowen (Lighthart and Shaffer, 1994)

$$F = \Delta[bact] \times H / \Delta T$$

$\Delta[bact]$: différence de concentration bactérienne

H : flux de chaleur $W.m^{-2}$

ΔT : différence de température mesurée à deux hauteurs entre 0,5 et 2,5 m.

Le tableau 1.7 répertorie les flux de micro-organismes provenant de l'atmosphère. Les flux déterminés par la méthode des gradients sur une culture de haricots et de luzerne sont proches. Le flux le plus faible est observé pour le désert.

TABLEAU 1.7 – Flux des micro-organismes provenant de l'atmosphère

Sources	Flux UFC $m^{-2} s^{-1}$	Méthodes employées ¹	Références
Désert Chaparral (USA)	5	R	Lighthart et Shaffer (1994)
Haricots	500	G	Lindemann et al. (1982)
Luzerne	540	G	Lindemann et al. (1982)
Blé	60	G	Lindemann et al. (1982)
Sol sec de culture	40	G	Lindemann et Upper (1985)
Sol humide de culture	155	G	Lindemann et Upper (1985)

¹ G méthodes des gradients ; R ratio de Bowen

1.4.1.4 Mécanismes d'aérosolisation des champignons

Les champignons du fait de leur écologie, ont développé des systèmes qui favorisent leur dissémination par l'air. La plupart des espèces de champignons identifiés dans l'air sont associées aux phyla *Ascomycota* et *Basidiomycota*. Les *Chytridiomycota* et *Zygomycota* sont moins détectés dans l'air (Elbert et al., 2007).

Les spores de champignons peuvent être classées en deux catégories, les sédentaires et les dispersantes (Brown, 1997).

- Les spores dites sédentaires sont plus résistantes que les autres spores mais elles ne sont pas adaptées à la dispersion. Les chlamydospores, les zygosporos et les teliospores en sont les principales.
- Le second type de spores dites, dispersantes, dont les plus importantes associées à ce mode sont les conidies, les sporangiospores, les ascospores, les basidiospores, et les urediniospores.

Concernant l'émission des spores de champignon, celle-ci peut être soit active soit passive. Le taux d'humidité joue également un rôle dans la sporulation. Des études se sont intéressées aux facteurs influençant l'émission des spores. Des auteurs ont montré que certaines spores, les téliospores, sont émises lorsque le taux d'humidité est faible et à l'inverse les ascospores et basidiospores sont émises lors d'une forte humidité (Herrero et al., 2006; Li et al., 2004).

1.4.1.4.1 Emission active

Les champignons ont développé de nombreux mécanismes d'émission active des spores. La taille des spores d'*Ascomycota* est comprise entre 2 et 20 µm de diamètre et elles sont contenues dans des ascospores. Leur émission se fait via la compression de fluide contenu dans l'ascospore. Cette violente décharge leur permet de s'aérosoliser de quelques millimètres à un centimètre dans l'air (Elbert et al., 2007).

Par contre l'émission des spores de *Basidiomycota* est différente. Leur taille est plus petite que celles des *Ascomycota*, de l'ordre de 2 à 10 µm. Le mécanisme d'émission est similaire à celui d'une "catapulte". Au bout terminal de la basidiospore du côté de l'hyphe, une goutte d'eau se forme et se développe jusqu'à avoir la même taille que la basidiospore. Ensuite elle fait pression sur l'hyphe libérant ainsi la spore à une distance pouvant atteindre entre 0,1 et 1,5 mm (Elbert et al., 2007).

1.4.1.4.2 Emission passive

La libération des spores peut se faire par contact entre une goutte d'eau et le réceptacle les contenant, par la gravité ou par le vent. Certaines espèces par un mouvement de torsion hygroscopique de l'hyphe lors de conditions sèches émettent des spores. Dans tous les cas, il n'y a pas d'émission de liquide avec spores comme pour l'émission active. De nombreux champignons utilisent le mécanisme passif pour sporuler comme *Aspergillus*, *Penicillium*

qui appartiennent au phylum *Ascomycota*. Certaines espèces de *Basidiomycota*, comme *Cladosporium* utilisent également ce mécanisme (Elbert et al., 2007).

1.4.2 Le transport dans l'air

1.4.2.1 La circulation atmosphérique

Le soleil en réchauffant les masses d'air provoque la circulation atmosphérique. Il réchauffe la surface de la Terre puis l'air ambiant en créant des mouvements ascendants. L'air en s'élevant est refroidi d'environ un degré tous les 100 m. Puis l'air froid redescend vers le sol. Ce mécanisme constitue un courant de convection, qui en météorologie est nommé cellule. Il existe trois cellules par hémisphère (Polaire, Ferrel et Hadley), elles sont disposées selon la latitude. Chacune des cellules est connectée par les dépressions et les anticyclones et également par le courant jet. Il s'agit d'un flux d'air rapide (la vitesse moyenne est estimée à environ 25 m s^{-1}) confiné que l'on trouve dans l'atmosphère à des altitudes comprises entre 6 et 15 km.

Concernant la circulation "locale", elle est peut être modifiée par différents paramètres. La circulation de l'air est perturbée dans les villes par la présence d'obstacles et indirectement la température augmente, créant un flux d'air (La brise "urbaine"). L'air est plus chaud dans les zones urbaines que dans les zones rurales.

Dans les régions côtières des phénomènes de brises de mer ou de terres sont observés. Ils sont liés au fait que l'eau a une inertie thermique plus élevée que la terre c'est à dire qu'elle se réchauffe lentement. La différence entre la terre et l'eau, le jour, permet la création d'une brise marine. La nuit le phénomène est inversé et c'est la création d'une brise de terre.

Les régions montagnardes présentent également des circulations d'air particulières. Dans ces régions, l'air provenant des vallées est réchauffé le long des pentes et monte durant la journée (brise de vallée). Tandis que la nuit l'air se refroidissant redescend le long des flancs, (brise de montagne), pouvant se charger en humidité (formation de brouillard).

Ces différents modes de circulation, permettent aux particules aérosolisées d'être transportées dans les masses d'air. Ces particules subissent de nombreuses forces dans l'air qui régissent leur temps de séjour dans l'air.

1.4.2.2 Forces exercées sur les particules aérosolisées

Les particules présentes dans l'air sont soumises à de nombreuses forces qui sont dues :

– au poids des particules : $P = m \times g$

m : masse de la particule

g : gravité ($9,81 \text{ m s}^{-2}$)

– à la poussée d'Archimède : $\Pi_A = \rho \times V_0 \times g$

ρ : résistance de l'air $1,3 \text{ kg m}^{-3}$

- V_0 : volume de la particule
- aux forces de frottement
- à la vitesse de déplacement

Tous ces paramètres influent sur le temps de séjour des particules dans l'air qui est de l'ordre de 3 à 14 jours pour une taille de particule comprise entre 1 et 3 μm (Burrows et al., 2009a; Raes et al., 2000). Lors du déplacement des particules dans l'air, les forces de frottement et le vecteur vitesse peuvent diminuer et /ou s'orienter de plusieurs façons (figure 1.7).

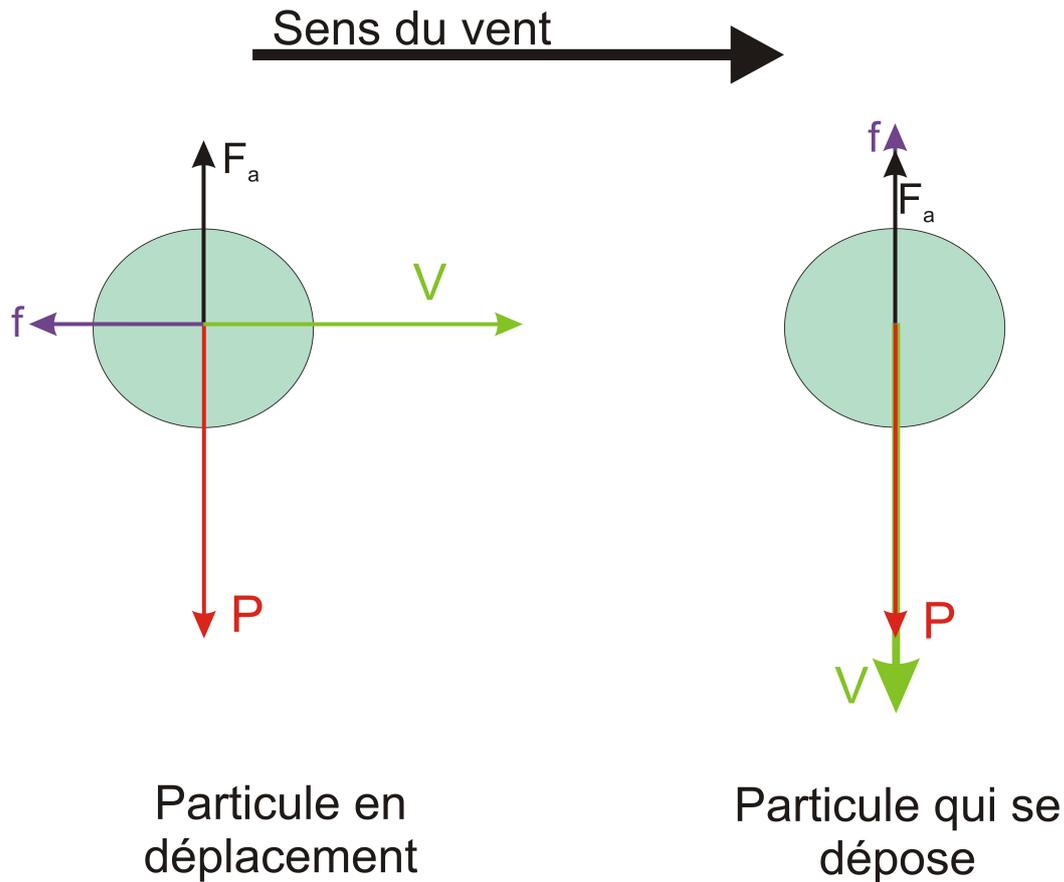


FIGURE 1.7 – Forces exercées sur les particules aérosolisées
 P : poids de la particule, f : forces de frottement,
 F_a : poussée d'Archimède, V : vecteur vitesse

1.4.2.3 La taille des bioaérosols

Les micro-organismes dans l'air ne sont jamais isolés et s'agrègent avec des particules également aérosolisées. Une corrélation positive entre les bactéries et les particules a été observée (Mancinelli and Shulls, 1978). Matthias-Maser *et al.* évaluent que les bioaérosols représentent 30% du nombre de particules totales ayant un diamètre compris entre 2 et 10 μm (Matthias-Maser and Jaenicke, 1995).

Huffman *et al.* après avoir analysé des prélèvements d'air, ont observé quatre pics majoritaires, 1,5 μm , 3 μm , 5 μm et 15 μm sur les profils granulométriques (Huffman et al., 2010). Le premier pic correspond aux bactéries seules, le second pic correspond soit aux agrégats de bactéries soit aux spores de champignons. Le pic à 5 μm peut correspondre à des amas de spores fongiques et le dernier pic pourrait être affilié au pollen.

La figure 1.8 représente la distribution des particules sur lesquelles les bactéries sont agglomérées dans l'air. Cette distribution a été obtenue en employant des techniques culturales (Lighthart, 1997). 50% des bactéries ayant pour origine un bioaérosol océanique s'agrègent sur des particules ayant une taille de 2 μm de diamètre contrairement à celles dont leur origine est terrestre (50% des bactéries observées sur des particules de 3 μm de diamètre) (Shaffer and Lighthart, 1997).

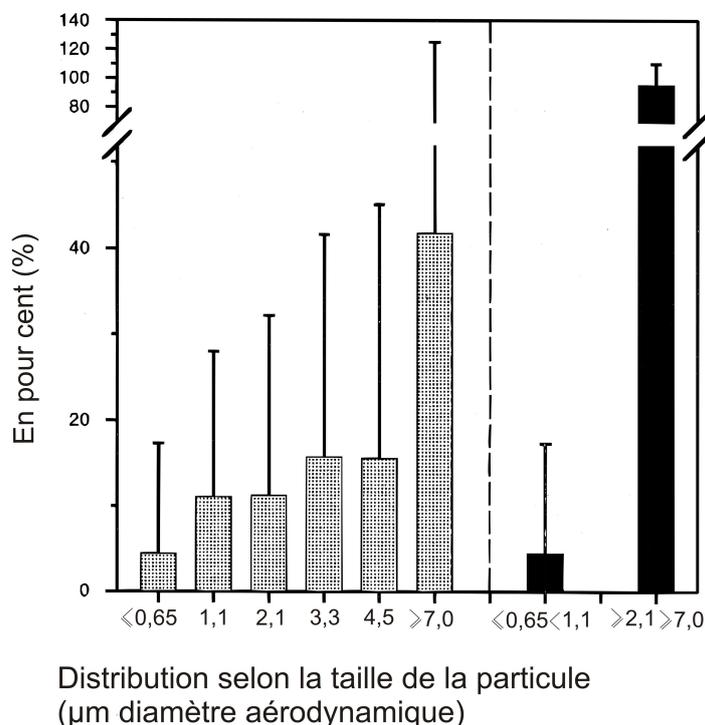


FIGURE 1.8 – Distribution des particules sur lesquelles les bactéries sont agglomérées dans l'air (à gauche), tandis qu'à droite, le graphique représente les bactéries libres et les bactéries associées aux particules (Lighthart, 1997)

1.4.3 La sédimentation

Lors de la sédimentation des particules, les forces de frottements et le vecteur vitesse augmentent conduisant à la sédimentation (figure 1.7). Il existe deux modes de sédimentation des particules qui sont soit le dépôt dit sec soit le dépôt dit humide.

1.4.3.1 Le dépôt sec

La sédimentation est l'ensemble des processus par lesquels les particules en suspension et en transit cessent de se déplacer et se déposent. Il est possible d'établir une vitesse de sédimentation d'après la loi de Stokes :

$$V = (D^2 \times (\rho_p - \rho_1) \times g) / 18\rho$$

- V correspond à la vitesse de sédimentation exprimée en cm s^{-1}
- D est le diamètre des particules en cm
- g est la constante d'accélération (980 cm s^{-2})
- ρ_p est la densité de la particule exprimée en g cm^{-3}
- ρ_1 est la densité de l'air ($0,001213 \text{ g cm}^{-3}$)
- ρ est la viscosité de l'air ($1,83 \times 10^{-4} \text{ g cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

Il est d'usage de considérer que toutes les particules sont sphériques et que la densité de la particule pour les micro-organismes est de 1 g cm^{-3} . La chute de la particule est fonction de sa masse. Seules les grosses particules se déposent car les petites particules ont une vitesse de sédimentation trop faible. Le tableau 1.8 recense la vitesse de sédimentation de quelques particules en fonction de leur taille (Pepper and Dowd, 2009).

TABLEAU 1.8 – Vitesse de sédimentation de quelques particules selon la loi de Stokes (Pepper and Dowd, 2009)

Diamètre de la particule en mm	Assignment	Vitesse de sédimentation en cm s^{-1}
1	Sable	$7,8 \times 10^3$
0,1	Limon	79
0,002	Spore de <i>Clostridiales</i>	$1,6 \times 10^{-2}$
0,001	Argile	$7,9 \times 10^{-5}$

La figure 1.9 répertorie la taille et la vitesse de sédimentation de certaines bactéries et champignons ainsi que des spores (Stetzenbach, 1992). La vitesse de sédimentation est la vitesse limite de chute d'une particule dans un air non turbulent.

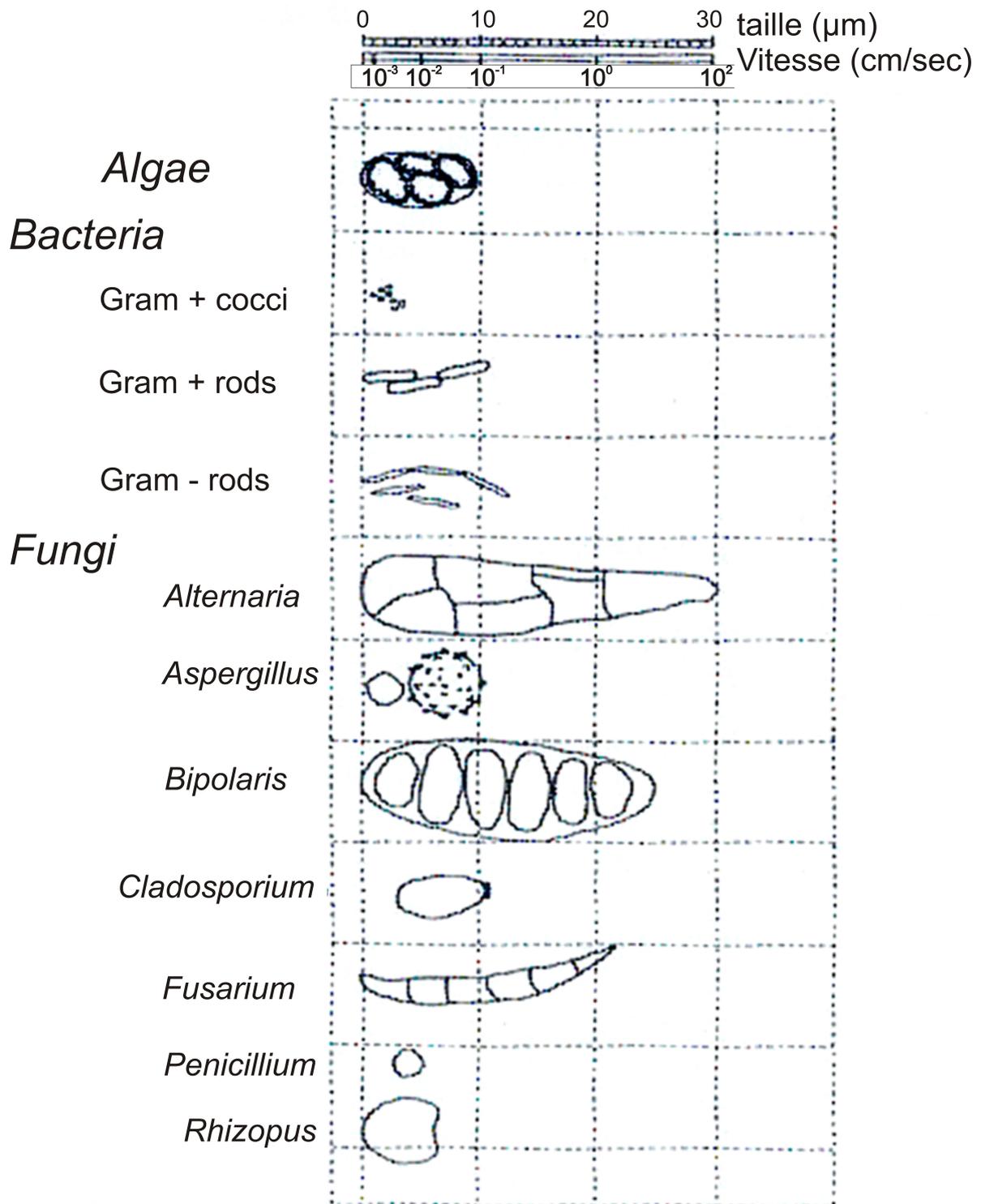


FIGURE 1.9 – Tailles et vitesses de sédimentation de certains micro-organismes (Stetzenbach, 1992)

Le flux de déposition des procaryotes en suspension dans l'air sec a été évalué en microscopie à épifluorescence. Il est estimé entre $7,7 \times 10^6$ et $1,4 \times 10^7$ cellules $\text{m}^{-2} \text{h}^{-1}$ (Sahu et al., 2005).

Il existe également le dépôt électrostatique. En effet les micro-organismes possèdent des charges électriques (Mainelis, 1999). Selon la charge rencontrée dans l'air, ils peuvent s'agglomérer avec des particules ayant une charge électrique opposée. Ce principe permet d'augmenter la taille des particules et ainsi la vitesse de sédimentation augmente.

1.4.3.2 Le dépôt humide

Le phénomène de précipitation (pluie et neige) est dû majoritairement à l'accroissement de la taille des gouttes d'eau dont la masse devient suffisamment importante pour vaincre les forces d'agitation. Ce grossissement peut s'expliquer par deux processus qui sont l'effet Bergeron et l'effet de coalescence. L'effet Bergeron correspond à un transfert (condensation) des gouttelettes d'eau vers les cristaux de glace présents dans les nuages. La masse des cristaux augmente et lorsqu'elle est suffisante, les cristaux sédimentent. Dans leur chute, ils fondent, formant la pluie. Le temps de formation d'une goutte de pluie par l'effet Bergeron est long car il faut 4 heures pour une goutte d'un diamètre de 2 mm et 16 heures pour une taille de 4 mm.

Concernant l'effet de coalescence, c'est un phénomène de formation de gouttelettes d'eau relativement grosses (capture d'autres gouttelettes lors de leur chute), qui voient leur taille augmenter. Cet effet est observé notamment lors d'un orage, des gouttes de pluie de 2 mm de diamètre se forment en seulement 2 heures.

Au cours de ce chapitre, nous avons vu que les micro-organismes aérosolisés vers l'atmosphère provenaient de différentes sources qui pouvaient être naturelles ou anthropiques. Les régions désertiques sont les sources émettant le plus de bioaérosols de part le monde loin devant les océans.

Les mécanismes d'aérosolisation des micro-organismes sont variables selon l'environnement : utilisant la formation de gouttelettes d'eau dans les environnements aquatiques, tandis qu'au sein des environnements terrestres, les particules sont aérosolisées par le vent.

Les champignons sont les seuls micro-organismes connus actuellement comme possédant deux types d'émission de dissémination des spores dans l'air. Cette libération est régie par les conditions environnementales. Le temps de résidence des micro-organismes au sein de l'atmosphère est dépendant de plusieurs paramètres qui sont les conditions météorologiques (vent, température, dessiccation...) ainsi que les propriétés physiques des particules.

Après avoir traité les différents types d'émission et de transport des bioaérosols dans l'atmosphère, intéressons-nous maintenant à la composition microbienne de ces bioaérosols.

La microbiologie des aérosols

Sommaire

2.1	Introduction	59
2.2	Composition microbienne	59
2.2.1	La structure des populations microbiennes dans l'air	59
2.2.2	L'état physiologique des micro-organismes	73
2.2.2.1	La sporulation	73
2.2.2.2	La viabilité	73
2.2.2.3	L'activité des micro-organismes	74
2.3	Dynamique temporelle et spatiale des bioaérosols	76
2.3.1	Variation temporelle	76
2.3.1.1	Variation saisonnière	76
2.3.1.2	Variation nyctémérale	79
2.3.2	Variation spatiale	80
2.3.3	Variation des concentrations microbiennes au sein de la colonne d'air	81
2.4	Les mécanismes de survie des micro-organismes	82
2.4.1	Les facteurs météorologiques	82
2.4.1.1	La température	82
2.4.1.2	L'humidité relative	84
2.4.2	Les radiations	85
2.4.3	Les nutriments présents dans l'atmosphère	85
2.5	Les impacts sanitaires associés aux bioaérosols	86
2.5.1	La réaction infectieuse	87
2.5.1.1	La transmission	87
2.5.1.2	L'inhalation	87
2.5.1.3	La dose infectante	89
2.5.2	La réaction allergique et ou inflammatoire	89
2.5.2.1	La broncho-pneumopathie obstructive	90

2.5.2.2	Le syndrome toxique de la poussière organique	90
2.5.2.3	La pneumonie d'hypersensibilité	90
2.5.2.4	L'asthme professionnel	90
2.5.3	Les toxines	91
2.5.3.1	Les mycotoxines	91
2.5.3.2	Les glucanes	91
2.5.3.3	Les endotoxines	91
2.5.4	Les études épidémiologiques	92
2.5.4.1	Etudes épidémiologiques dans les industries	92
2.5.4.2	Etudes épidémiologiques dans les procédés de dépollution en milieu professionnel	94
2.5.4.3	Etudes épidémiologiques auprès des riverains	95

2.1 Introduction

Au cours de ce chapitre, nous aborderons la composition microbienne présente dans l'atmosphère ainsi que les mécanismes de survie mis en place par les micro-organismes pour rester viables dans cet environnement non favorable à leur développement. Il sera ensuite question des impacts sanitaires qui peuvent être associés aux bioaérosols sur l'homme.

2.2 Composition microbienne

2.2.1 La structure des populations microbiennes dans l'air

L'analyse de la diversité microbienne dans l'air a commencé dès 1966 par Fulton *et al.*, (Fulton and Mitchell, 1966; Fulton, 1966a,c,b; Timmons et al., 1966). Le tableau 2.1 présente les principaux genres bactériens et fongiques qui ont été identifiés par l'utilisation de méthodes culturales. De nombreuses études ont identifié les genres bactériens : *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* ainsi que les genres fongiques suivants : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Penicillium*.

TABLEAU 2.1: Genres microbiens identifiés par culture dans des échantillons d'air

Domaine	Phylum / Genres	Références
Bactéries	<i>Actinobacteria</i>	
	<i>Arthrobacter</i>	Shaffer et Lighthart, 1997
	<i>Aureobacterium</i>	Shaffer et Lighthart, 1997
	<i>Brevibacterium</i>	Tong et al., 1993
	<i>Cellulomonas</i>	Shaffer et Lighthart, 1997
	<i>Clavibacter</i>	Shaffer et Lighthart, 1997
	<i>Corynebacterium</i>	Fulton, 1966; Shaffer et Lighthart, 1997; Tong et al., 1993
	<i>Curtobacterium</i>	Shaffer et Lighthart, 1997
	<i>Microbacterium</i>	Shaffer et Lighthart, 1997
	<i>Micrococcus</i>	Fulton, 1966; Imshenetsky et al., 1978; Mancinelli et Shulls, 1978 Shaffer et Lighthart, 1997, Tong et al., 1993
	<i>Mycobacterium</i>	Imshenetsky et al., 1978
	<i>Rhodococcus</i>	Shaffer et Lighthart, 1997
	<i>Streptococcus</i>	Mancinelli et Shulls, 1978
	<i>Streptomyces</i>	Radon et al., 2002
	<i>Firmicutes</i>	
	<i>Bacillus</i>	Fulton, 1966; Fuzzi et al., 1997; Mancinelli et Shulls, 1978 Sabariego et al., 2000; Shaffer et Lighthart, 1997; Tong et al., 1993
	<i>Aerococcus</i>	Mancinelli et Shulls, 1978
	<i>Clostridium</i>	Mancinelli et Shulls, 1978
	<i>Lactobacillus</i>	Mancinelli et Shulls, 1978
	<i>Leuconostoc</i>	Mancinelli et Shulls, 1978
	<i>Listeria</i>	Tong et al., 1993
	<i>Pediococcus</i>	Mancinelli et Shulls, 1978
	<i>Peptococcus</i>	Mancinelli et Shulls, 1978
	<i>Peptostreptococcus</i>	Mancinelli et Shulls, 1978
	<i>Sarcina</i>	Mancinelli et Shulls, 1978
	<i>Sporobacillus</i>	Mancinelli et Shulls, 1978
	<i>Sporosarcina</i>	Mancinelli et Shulls, 1978
	<i>Staphylococcus</i>	Mancinelli et Shulls, 1978; Tong et al., 1993
	<i>α-Proteobacteria</i>	
	<i>Ochrobactrum</i>	Shaffer et Lighthart, 1997
	<i>Paracoccus</i>	Mancinelli et Shulls, 1978
	<i>β-Proteobacteria</i>	
	<i>Alcaligenes</i>	Shaffer et Lighthart, 1997
	<i>Neisseria</i>	Mancinelli et Shulls, 1978
	<i>γ-Proteobacteria</i>	
	<i>Acinetobacter</i>	Fuzzi et al., 1997; Shaffer et Lighthart, 1997

Domaine	Phylum / Genres	Références
	<i>Enterobacter</i>	Shaffer et Lighthart, 1997
	<i>Klebsiella</i>	Shaffer et Lighthart, 1997
	<i>Pseudomonas</i>	Fuzzi et al., 1997; Mancinelli et Shulls, 1978
		Shaffer et Lighthart, 1997
	<i>Xanthomonas</i>	Mancinelli et Shulls, 1978; Shaffer et Lighthart, 1997
Champignons		
	Ascomycota	
	<i>Alternaria</i>	Angulo-Romero et al., 1999; Burch et Levetin et al., 2002; Fulton, 1966 Katial et al., 1997; Radon et al., 2002; Sabariego et al., 2000
	<i>Aspergillus</i>	Fulton, 1966; Fuzzi et al., 1997; Imshenetsky et al., 1978 Jones et Cookson et al., 1983; Radon et al., 2002
	<i>Aureobasidium</i>	Juozaitis et al., 1998
	<i>Botrytis</i>	Radon et al., 2002
	<i>Candida</i>	Fuzzi et al., 1997; Juozaitis et al., 1998
	<i>Cladosporium</i>	Burch et Levetin et al., 2002; Katial et al., 1997; Radon et al., 2002; Sabariego et al., 2000
	<i>Epicoccum</i>	Burch et Levetin et al., 2002; Katial et al., 1997
	<i>Eurotium</i>	Radon et al., 2002
	<i>Fusarium</i>	Fulton, 1966
	<i>Geotrichum</i>	Ariya et al., 2002; Fuzzi et al., 1997
	<i>Penicillium</i>	Fulton, 1966; Fuzzi et al., 1997; Juozaitis et al., 1998; Radon et al., 2002
	<i>Phoma</i>	Fulton, 1966; Juozaitis et al., 1998
	Basidiomycota	
	<i>Ustilago</i>	Fulton, 1966; Sabariego et al., 2000
	Strameonopiles	
	<i>Pythium</i>	Fuzzi et al., 1997; Juozaitis et al., 1998

Depuis, les techniques moléculaires ont fait leur apparition mais la diversité microbienne de l'air est peu étudiée. Le tableau 2.2 répertorie la diversité bactérienne de l'air extérieur et intérieur effectuée sur dix environnements révélée par les inventaires moléculaires (Bowers et al., 2009; Brodie et al., 2007; DeSantis et al., 2007; Despres et al., 2007; Fahlgren et al., 2010; Fierer et al., 2008; Maron et al., 2005; Nehme et al., 2008; Polymenakou et al., 2008; Radosevich et al., 2002; Tringe et al., 2008).

On constate que d'après le tableau 2.2, dans l'air, la diversité bactérienne est représentée par un faible nombre de phyla (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* et *Bacteroidetes*). Le phylum *Proteobacteria* domine dans les différents inventaires effectués. Dans un environnement intérieur, il représente 90% du nombre total des séquences. Au sein des *Proteobacteria*, les phyla α -*Proteobacteria* et γ -*Proteobacteria* sont les plus représentés. Le phylum *Firmicutes* domine dans l'étude réalisée par Amato *et al.* dans les nuages (Amato et al., 2006). Il ne s'agit pas d'inventaire, car les micro-organismes ont été cultivés puis ensuite certains ont été identifiés par séquençage de l'ADNr 16S. Seulement deux phyla ont été identifiés, les *Firmicutes* et les *Proteobacteria*. Pour cette étude, des prélèvements ont été réalisés en hiver et en été. Les résultats obtenus montrent que les *Firmicutes* dominent en hiver alors qu'en été les phyla *Firmicutes* et γ -*Proteobacteria* ont la même abondance. Cette différence peut provenir du fait que les bactéries affiliées aux γ -*Proteobacteria* soient moins sensibles aux rayons UV que les autres micro-organismes (Agogue et al., 2005). La seconde hypothèse est la suivante : la végétation en hiver est au repos. En été les micro-organismes phytopathogènes sont présents car la végétation est active.

En plus de l'inventaire moléculaire effectué par Brodie *et al.*, ils ont utilisé une puce à ADN. Cette puce a été employée sur des échantillons d'air issus de villes. En comparant les

résultats obtenus pour deux villes, il en ressort que certains phyla (*Acidobacteria*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* (α , β , δ , ϵ et γ) et *Verrumicrobia*), sont communs aux deux et sont présents pendant toute la période de l'échantillonnage (17 semaines) (Brodie et al., 2007). Pour le phylum *Actinobacteria*, ce sont les espèces affiliées à la classe des *Actinomycetales* qui sont présentes lors des 17 semaines de prélèvement, tandis que pour le phylum des *Firmicutes*, les classes identifiées sont les *Bacilli* et les *Clostridia*.

TABLEAU 2.2: Diversité microbienne de l'air dans différents environnements (exprimé en pourcentage du nombre total de séquences d'ADNr 16S)

Phyla	Genres	Brodie <i>et al.</i> , 2007		Bowers <i>et al.</i> , 2009		Fierer <i>et al.</i> , 2008		Fahlgren <i>et al.</i> , 2010		DeSantis <i>et al.</i> , 2007		Nehme <i>et al.</i> , 2007	
		Urbain	430	Atmosphère	237	Urbain	1966	Côtier	221	Urbain	485	Porchère	59
Acidobacteria	Gp3	1,16	2,53	0,36	1,4	1,03							
	Gp6	0,93	0,42	0,36	0,45	0,82							
	Gp4	0,23	0,42		0,45	0,21							
	Gp6		1,27		0,45								
	Gp10		0,42										
Actinobacteria	<i>Ilumatobacter</i>	14,88	3,80	3,71	18,6	17,32							
	<i>Iamia</i>	0,23	0,42	0,05	2,71	0,21							
	<i>Rubrobacter</i>	0,47	1,69	0,10	0,45	0,21							
	<i>Solirubrobacter</i>	1,40	0,42	0,05	0,45	0,41							
	<i>Nocardioide</i>	0,23	1,27	0,10	0,45	0,21							
	<i>Friedmanniella</i>	0,70		0,10	0,45	0,41							
	<i>Rhodococcus</i>	0,47		0,10	0,90	0,82							
	<i>Williamsia</i>	0,23		0,97	0,45	0,41							
	<i>Micromonospora</i>	0,23		0,15	3,62	0,41							
	<i>Actinoplanes</i>	0,23		0,05	0,45	0,21							
	<i>Nocardioopsis</i>	0,23		0,31	1,36	0,82							
	<i>Brachybacterium</i>	0,23		0,10	0,45	0,41							
	<i>Knoellia</i>	0,23		0,15	2,71	0,41							
	<i>Tetrasphaera</i>	0,23		0,51	4,07	0,41							
	<i>Ornithinimicrobium</i>	0,93		nd	0,97	0,21							
	<i>Jamibacter</i>	0,23				0,21							
	<i>Brevibacterium</i>	0,93				0,21							
	<i>Nesterenkonkia</i>	0,23				0,21							
	<i>Agrococcus</i>	0,23				0,21							
	<i>Streptomyces</i>	0,70				0,21							
	<i>Blastococcus</i>	0,47				0,62							
	<i>Pseudonocardia</i>	0,23				0,21							
	nd	5,58				0,82							
						0,21							
						0,21							
						0,41							
						1,24							
						0,21							
						0,41							
						0,21							
						0,82							
					0,41								
					0,82								
					0,41								
					0,21								

Suite du tableau

	Brodie <i>et al.</i> , 2007 Urbain	Bowers <i>et al.</i> , 2009 Atmosphère	Fierer <i>et al.</i> , 2008 Urbain	Fahlgren <i>et al.</i> , 2010 Côtier	DeSantis <i>et al.</i> , 2007 Urbain	Neheme <i>et al.</i> , 2007 Porcherie
Nombre de séquences	430	237	1966	221	485	59
<i>Actinobacteria</i>					Yaniella nd	0,21 4,33
<i>Bacteroidetes</i>	2,79	8,9	24,16		2,70	8,47
	<i>Larkinella</i> 0,47	<i>Cloacibacterium</i> 1,3	<i>Planobacterium</i> 0,05	<i>Chryseobacterium</i> 0,45	<i>Flavisolibacter</i> 1,03	<i>Prevotella</i> 6,78
	<i>Niasella</i> 0,23	<i>Flavobacterium</i> 1,7	<i>Flavobacterium</i> 0,10	<i>Prevotella</i> 0,45	<i>Larkinella</i> 0,41	<i>Barnesiella</i> 1,69
	<i>Flavisolibacter</i> 0,93	<i>Flavisolibacter</i> 0,4	<i>Chryseobacterium</i> 0,71	<i>Hymenobacter</i> 1,36	<i>Niasella</i> 0,21	
	nd 1,16	<i>Segetibacter</i> 0,8	<i>Sediminibacterium</i> 0,46	<i>Adhaeribacter</i> 0,45	nd 1,03	
		nd 4,6	<i>Flavisolibacter</i> 0,05	<i>Pedobacter</i> 0,45		
			<i>Segetibacter</i> 0,61	<i>Ferruginibacter</i> 0,45		
			<i>Adhaeribacter</i> 0,31	<i>Flavisolibacter</i> 1,81		
			<i>Hymenobacter</i> 1,12	<i>Segetibacter</i> 0,45		
			nd 20,75	nd 4,52		
<i>Chlorobi</i>			0,10			
			<i>Chlorobium</i> 0,10			
<i>Chloroflexi</i>	1,63	0,42	0,31	0,45	1,86	
	<i>Chloroflexus</i> 0,23	nd 0,42	<i>Longilinea</i> 0,05	<i>Sphaerobacter</i> 0,45	<i>Chloroflexus</i> 0,21	
	<i>Sphaerobacter</i> 0,93		nd 0,25		<i>Sphaerobacter</i> 0,82	
	nd 0,47				nd 0,82	
<i>Cyanobacteria</i>	1,63	2,11		2,7	2,27	
	<i>Streptophyta</i> 0,93	<i>Bacillariophyta</i> 0,42		<i>GpIX</i> 0,45	<i>Chlorophyta</i> 0,21	
	nd 0,70	<i>Streptophyta</i> 1,27		<i>GpI</i> 0,90	<i>GpI</i> 0,21	
		nd 0,42		nd 1,36	<i>GpIV</i> 0,21	
				<i>Streptophyta</i> 1,03	<i>Streptophyta</i> 1,03	
				nd 0,62	nd 0,62	
<i>Deinococcus-Thermus</i>	1,16				1,03	
	<i>Truepera</i> 0,47				<i>Deinococcus</i> 0,62	
	<i>Deinococcus</i> 0,70				<i>Truepera</i> 0,41	
<i>Firmicutes</i>	54,19	8,02	3,26	39,4	52	91,53
	<i>Turricibacter</i> 0,93	<i>Streptococcus</i> 0,42	<i>Turricibacter</i> 0,10	<i>Turricibacter</i> 0,45	<i>Acetivibrio</i> 0,62	<i>Lactobacillus</i> 1,69
	<i>Symbiobacterium</i> 0,23	<i>Lactococcus</i> 0,42	<i>Peptoniphilus</i> 0,10	<i>Lactobacillus</i> 4,07	<i>Aerococcus</i> 0,21	<i>Blautia</i> 1,69
	<i>Gracilibacter</i> 0,23	<i>Thermoactinomyces</i> 0,42	<i>Finegoldia</i> 0,20	<i>Leuconostoc</i> 0,45	<i>Ammoniphilus</i> 0,41	<i>Anaerovorax</i> 1,69
	<i>Clostridium</i> 2,09	<i>Planomicrobium</i> 0,42	<i>Anaerococcus</i> 0,10	<i>Streptococcus</i> 3,62	<i>Anaerobacter</i> 0,21	<i>Faecalibacterium</i> 3,39
	<i>Acetivibrio</i> 0,47	<i>Bacillus</i> 4,22	<i>Planomicrobium</i> 0,31	<i>Planomicrobium</i> 0,45	<i>Bacillus</i> 29,48	<i>Butyrivibrio</i> 5,08
	<i>Desulfotomaculum</i> 0,47	<i>Tumebacillus</i> 0,84	<i>Jeotgaliococcus</i> 0,05	<i>Gemella</i> 0,45	<i>Brevibacillus</i> 0,21	<i>Ruminococcus</i> 3,39
	<i>Pelotomaculum</i> 0,23	nd 1,27	<i>Staphylococcus</i> 0,10	<i>Jeotgaliococcus</i> 0,45	<i>Clostridium</i> 2,06	<i>Subdoligranulum</i> 3,39
	<i>Sporosarcina</i> 0,47		<i>Geobacillus</i> 0,05	<i>Staphylococcus</i> 0,45	<i>Cohnella</i> 0,21	<i>Sporobacter</i> 1,69
	<i>Paenispinosarcina</i> 0,23		<i>Tumebacillus</i> 0,25	<i>Paenibacillus</i> 1,36	<i>Desulfotomaculum</i> 0,41	<i>Coproccocus</i> 5,08
	<i>Staphylococcus</i> 0,93		<i>Abiotrophia</i> 0,10	<i>Brevibacillus</i> 0,45	<i>Enterococcus</i> 0,62	<i>Peptostreptococcus</i> 1,69
	<i>Salinitococcus</i> 0,23		<i>Lactobacillus</i> 0,10	<i>Lysinibacillus</i> 0,45	<i>Esiguobacterium</i> 0,21	<i>Phascolarctobacterium</i> 3,39

Suite du tableau

Nombre de séquences	Brodie et al., 2007		Bowers et al., 2009		Fierer et al., 2008		Fahlgren et al., 2010		DeSantis et al., 2007		Neheme et al., 2007
	Urbain	430	Atmosphère	237	Urbain	1966	Côtier	221	Urbain	485	
Proteobacteria		18,37		65,8		67,55		10,4			11,96
α-Proteobacteria		0,23		0,8		0,25					0,21
	<i>Phenyllobacterium</i>	0,23	<i>Novosphingobium</i>	0,42	<i>Brevundimonas</i>	0,20	<i>Sphingobium</i>	1,36	<i>Phenyllobacterium</i>		0,21
	<i>Sandaracinobacter</i>	0,23	<i>Sphingopyxis</i>	0,84	<i>Phenyllobacterium</i>	0,05	<i>Novosphingobium</i>	0,45	<i>Devosia</i>		0,21
	<i>Sphingomonas</i>	2,56	<i>Sphingomonas</i>	0,84	<i>Sphingomonas</i>	0,56	<i>Sphingomonas</i>	0,45	<i>Chelatococcus</i>		0,21
	<i>Rubellimicrobium</i>	0,93	<i>Methylobacterium</i>	0,84	<i>Sphingobium</i>	0,81	<i>Methylobacterium</i>	0,90	<i>Methylobacterium</i>		0,41
	<i>Amaricoccus</i>	0,23	<i>Mesorhizobium</i>	0,84	<i>Rosomonas</i>	0,05	<i>Balneimonas</i>	0,90	<i>Rhizobium</i>		0,21
	<i>Paracoccus</i>	0,47	<i>Phyllobacterium</i>	1,27	<i>Skermanella</i>	0,05	<i>Bradyrhizobium</i>	0,45	<i>Balneimonas</i>		0,62
	<i>Devosia</i>	0,23	<i>Rhodoplanes</i>	0,84	<i>Paracoccus</i>	0,15	<i>Paracoccus</i>	1,36	<i>Altererythrobacter</i>		0,21
	<i>Rhizobium</i>	0,23	<i>Bradyrhizobium</i>	0,42	<i>Rhizobium</i>	0,66	<i>Rubellimicrobium</i>	0,90	<i>Porphyrrobacter</i>		0,41
	<i>Methylobacterium</i>	0,47	<i>Bosea</i>	0,42	<i>Aipta</i>	0,10	<i>Skermanella</i>	0,90	<i>Sandaracinobacter</i>		0,21
	<i>Skermanella</i>	0,23	nd	3,38	<i>Bradyrhizobium</i>	0,76	<i>Paracraurococcus</i>	0,45	<i>Sphingomonas</i>		2,47
	<i>Defluviococcus</i>	0,23	nd	0,05	<i>Mesorhizobium</i>	0,05	nd	2,26	<i>Amaricoccus</i>		0,21
	<i>Craurococcus</i>	0,47	nd	3,56	nd	3,56			<i>Rubellimicrobium</i>		1,24
	<i>Rosomonas</i>	0,47							<i>Paracoccus</i>		0,41
	nd	3,95							<i>Defluviococcus</i>		0,41
									<i>Skermanella</i>		0,21
									<i>Craurococcus</i>		0,62
									<i>Rosomonas</i>		0,41
									nd		3,30
β-Proteobacteria		3,95		28,27		5,49		4,98			3,92
	<i>Massilia</i>	0,47	<i>Hydrogenophilus</i>	5,06	<i>Nitrosospira</i>	0,41	<i>Massilia</i>	0,90	<i>Massilia</i>		0,41
	<i>Achromobacter</i>	0,70	<i>Tepidimonas</i>	5,91	<i>Aquabacterium</i>	0,61	<i>Herbaspirillum</i>	1,36	<i>Achromobacter</i>		0,62
	<i>Burkholderia</i>	2,79	<i>Ralstonia</i>	0,42	<i>Burkholderia</i>	0,25	<i>Ozallibacterium</i>	0,45	<i>Burkholderia</i>		2,47
			<i>Burkholderia</i>	6,75	<i>Herbaspirillum</i>	0,05	<i>Burkholderia</i>	0,45	nd		0,41
			<i>Schlegella</i>	1,69	<i>Massilia</i>	0,10	<i>Nitrosospira</i>	0,45			
			<i>Diaphorobacter</i>	2,53	<i>Acidovorax</i>	0,56	nd	1,36			
			<i>Acidovorax</i>	1,69	<i>Pelomonas</i>	0,41					
			<i>Massilia</i>	0,42	<i>Variovorax</i>	0,51					
			nd	3,80	<i>Delftia</i>	0,71					
					<i>Roseateles</i>	0,10					
					nd	1,78					
γ-Proteobacteria		2,33		26,16		54,60		5,4			2,06
	<i>Caulobacter</i>	0,23	<i>Escherichia/Shigella</i>	1,27	<i>Trabulsilla</i>	0,05	<i>Haemophilus</i>	0,45	<i>Xanthomonas</i>		0,21
	<i>Enterobacter</i>	0,23	<i>Pseudomonas</i>	3,80	<i>Rahnella</i>	0,05	<i>Acetobacter</i>	2,71	<i>Lysobacter</i>		0,21
	<i>Erwinia</i>	0,23	<i>Enhydrobacter</i>	3,80	<i>Stenotrophomonas</i>	0,20	<i>Pseudomonas</i>	0,90	<i>Perthacidibaca</i>		0,21
	<i>Serratia</i>	0,23	<i>Acinetobacter</i>	15,61	<i>Neusikia</i>	0,31	<i>Thermomonas</i>	0,45	<i>Acinetobacter</i>		0,21
			nd	1,69	<i>Halitea</i>	0,10	nd	0,90	<i>Pseudomonas</i>		0,41
					<i>Enhydrobacter</i>	0,41			<i>Enterobacter</i>		0,21
					<i>Acinetobacter</i>	0,76			<i>Erwinia</i>		0,21
					<i>Xanthomonas</i>	0,15			<i>Serratia</i>		0,21

Suite du tableau

	Polymenakou <i>et al.</i> , 2008 Aérosol désert	Maron <i>et al.</i> , 2005 Rural	Radosевич <i>et al.</i> , 2002 Salt Lake City	Tringe <i>et al.</i> , 2008 Centres commerciaux
Nombre de séquences	221	102	145	air 1 2659 air 2 3063
Actinobacteria	<i>Rothia</i> 0,45 <i>Rubrobacter</i> 2,71 <i>Streptomyces</i> 0,45 nd 3,17			
Bacteroidetes	<i>Adhaeribacter</i> 10,41 <i>Chryseobacterium</i> 0,45 <i>Ferruginibacter</i> 0,45 <i>Flavisolibacter</i> 1,81 <i>Hymenobacter</i> 1,36 <i>Prevotella</i> 0,45 <i>Segetibacter</i> 0,45 nd 4,98	<i>Terrimonas</i> 4,9 nd 3,92	<i>Chryseobacterium</i> 2,8 <i>Dyadobacter</i> 0,26 <i>Pedobacter</i> 0,94 <i>Sphingobacterium</i> 0,04 nd 0,00 0,04 0,49 0,11 0,23	1,84 1,40 0,26 0,00 0,94 0,00 0,04 0,00 0,49 1,18 0,11 0,23
Chloroflexi	<i>Sphaerobacter</i> 0,45			
Cyanobacteria	GpI 2,71 nd 0,90 1,81	nd 0,98		
Firmicutes	<i>Anaerococcus</i> 39,37 <i>Bacillus</i> 1,81 <i>Brevibacillus</i> 10,86 <i>Erignobacterium</i> 0,45 <i>Gallcola</i> 0,90 <i>Gemella</i> 0,45 <i>Jeotgalibacillus</i> 0,90 <i>Jeotgaliococcus</i> 0,45 <i>Lactobacillus</i> 4,07 <i>Leuconostoc</i> 0,45 <i>Oceanobacillus</i> 0,45 <i>Paenibacillus</i> 1,36 <i>Planomicrobium</i> 0,45 <i>Staphylococcus</i> 0,45 <i>Streptococcus</i> 3,62 <i>Terribacillus</i> 0,45 <i>Turnebacillus</i> 0,90 <i>Turricibacter</i> 0,45 nd 9,95	<i>Bacillus</i> 10,78 <i>Subdoligranulum</i> 2,94 nd 0,98 6,86	<i>Bacillus</i> 0,71 <i>Halobacillus</i> 0,00 <i>Carnobacterium</i> 0,00 <i>Desemzia</i> 0,23 nd 0,62 0,45 1,67	3,00 0,49 0,00 0,23 0,04 0,00 0,23 0,62 0,45 1,67

Suite du tableau

	Polymenakou <i>et al.</i> , 2008 Aérosol désert	Maron <i>et al.</i> , 2005 Rural	Radosevich <i>et al.</i> , 2002 Salt Lake City	Tringe <i>et al.</i> , 2008 Centres commerciaux
Nombre de séquences	221	102	145	air 1 air 2 2659 3063
<i>Fusobacteria</i>	0,45 0,45			
<i>Gemmatimonadetes</i>				
<i>Nitrospira</i>				
<i>Planctomycetes</i>				
<i>Proteobacteria</i>	20,81	53,92	40,7	91,05 75,02
<i>α-Proteobacteria</i>	10,41	18,63	15,9	57,95 48,78
<i>Balneimonas</i>	0,90			0,15 2,55
<i>Bradyrhizobium</i>	0,45			56,49 43,85
<i>Methylobacterium</i>	0,90			0,04 0,13
<i>Novosphingobium</i>	0,45			0,04 0,07
<i>Paracoccus</i>	1,36			0,08 0,00
<i>Paracraurococcus</i>	0,45			0,04 0,00
<i>Rubellimicrobium</i>	0,90			0,04 0,00
<i>Sfermanella</i>	0,90			0,79 1,14
<i>Sphingobium</i>	1,36			0,15 0,00
<i>Sphingomonas</i>	0,45			0,15 1,04
nd	2,26			
<i>β-Proteobacteria</i>	4,98	21,57	15,9	2,59 2,97
<i>Burkholderia</i>	0,45			0,00 0,03
<i>Herbaspirillum</i>	1,36			0,00 0,07
<i>Nitrosospira</i>	0,45			0,04 0,00
<i>Oxalicibacterium</i>	0,45			1,58 0,13
nd	1,36			0,90 0,42
<i>Janthinobacterium</i>				0,00 1,53
<i>Massilia</i>				0,08 0,78
nd				
<i>Achromobacter</i>				
<i>Acidovorax</i>				
<i>Comamonas</i>				
<i>Delftia</i>				
<i>Novosphingobium</i>				
<i>Massilia</i>				
nd				
<i>Acinetobacter</i>				
<i>Psychrobacter</i>				
<i>Pseudomonas</i>				
<i>Stenotrophomonas</i>				
nd				
<i>γ-Proteobacteria</i>	5,43	5,88	11	30,50 23,25
<i>Acinetobacter</i>	2,71			0,00 10,74
<i>Psychrobacter</i>	0,45			0,00 0,59
<i>Pseudomonas</i>	0,90			0,68 0,62
<i>Haemophilus</i>	0,45			29,82 9,92
<i>Thermomonas</i>	0,45			0,00 1,37
<i>Oceanisphaera</i>	0,45			

Suite du tableau

	Polymenakou <i>et al.</i> , 2008 Aérosol désert	Maron <i>et al.</i> , 2005 Rural	Radosevich <i>et al.</i> , 2002 Salt Lake City	Tringe <i>et al.</i> , 2008 Centres commerciaux	
Nombre de séquences	221	102	145	air 1	air 2
				2659	3063
<i>δ-Proteobacteria</i>	nd	4,90 4,90	8,3	0,00 0,00	0,03 0,03
OP10	0,45				
OP10	0,45				
TM7			0,7		0,07
<i>Verrucomicrobia</i>	0,45	0,98			
nd	0,45	<i>Opitutus</i>			
nd	3,62	12,75		1,92	0,33

¹ non déterminé

Les espèces surlignées ont été identifiées dans les 11 inventaires

Le tableau 2.3 recense les inventaires fongiques d'air réalisés dans différents environnements (Bowers et al., 2009; Frohlich-Nowoisky et al., 2009; Pitkaranta and Auvinen, 2008). Au sein de ces différents inventaires, on constate que les phyla *Ascomycota* et *Basidiomycota* dominent. Ces deux phyla semblent faire partie du bruit de fond de l'air pour les champignons. La concentration fongique présente dans l'air varie au cours de l'année car différents types de spores sont émises en fonction des saisons. O'Gorman *et al.* ont mesuré la concentration de quatre espèces de champignons (*Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* dont (*Aspergillus fumigatus*) et *Alternaria*) au cours de l'année. Ces quatre espèces ont des pics de concentration répartis sur l'année (*Cladosporium* en juin, *Penicillium* en août et en novembre, *Aspergillus* présente trois pics de forte concentration en mars, en août et en novembre tandis que l'espèce *Alternaria* est concentrée tout au long de l'année, inférieure à 10 UFC m⁻³) (OGorman and Fuller, 2008).

La concentration fongique dans l'air est en moyenne de 930 UFC m⁻³, réalisée sur 1700 échantillons d'air. Les champignons les plus retrouvés sont *Cladosporium*, *Penicillium* et *Aspergillus*, il sont retrouvés dans 92, 77 et 49 % des échantillons. Ils ont été détectés toute l'année. Les concentrations médianes sont de 200 UFC m⁻³ pour *Cladosporium*, de 50 UFC m⁻³ pour *Penicillium* et de 20 UFC m⁻³ pour *Aspergillus* (Shelton et al., 2002).

TABLEAU 2.3: Diversité fongique dans l'air prélevé dans différents environnements (exprimé en pourcentage du nombre total de séquences d'ADNr)

Fröhlich-Nowoisky <i>et al.</i> , 2009 Urbain		Pitkaranta <i>et al.</i> , 2008 Air intérieur immeubles		Bowers <i>et al.</i> , 2009 Atmosphère				
Nombre de séquences		1513		394		227		
Phyla	Classes	Classes		Classes		Genres dominants		Classes
Ascomycota	<i>Sordariomycetes</i>	34		39				72
	<i>Dothideomycetes</i>	22	<i>Dothideomycetes</i>	20	<i>Cladosporium, Leptosphaerulina</i>	<i>Dothideomycetes</i>		49
	<i>Eurotiomycetes</i>	18			<i>Aureobasidium, Macrophoma</i>	<i>Eurotiomycetes</i>		18
	<i>Leotiomycetes</i>	15			<i>Phaeosphaeriaceae</i>	<i>Sordariomycetes</i>		4
	<i>Saccharomycetes</i>	13	<i>Ascomycetes</i>	10				
	<i>Lecanoromycetes</i>	2	<i>Sordariomycetidae</i>	2				
	<i>Orbiliomycetes</i>	2	<i>Saccharomycetidae</i>	2	<i>Saccharomyces</i>			
	Autres classes	1	<i>Leotiomycetidae</i>	2	<i>Hypogymnia</i>			
		27	Autres	3				
		64		59,4				5
Basidiomycota	<i>Agaricomycetes</i>	87	<i>Agaricomycetes</i>	32		<i>Agaricomycetes</i>		5
	<i>Pucciniomycetes</i>	5	<i>Tremellomycetes</i>	12	<i>Cryptococcus</i>			
	<i>Tremellomycetes</i>	3	<i>Exobasidiomycetes</i>	9	<i>Malassezia</i>			
	<i>Ustilaginomycetes</i>	1	<i>Urediniomycetes</i>	5	<i>Thekopsora, Chrysomya</i>			
	<i>Exobasidiomycetes</i>	1	<i>Basidiomycetes</i>	1				
	<i>Wallemiomycetes</i>	1	Autres	0,4				
	<i>Microbotryomycetes</i>	1						
	<i>Cystobasidiomycetes</i>	0,4						
	Autres classes	1						
		1						
Zygomycota		1						10
		0,5		1,3		<i>Mucorales</i>		13
nd¹								

¹ non déterminé

Gilbert *et al.* ont répertorié les principaux micro-organismes (bactéries et champignons) dans des bioaérosols émis par différentes activités agricoles et industrielles (tableau 2.4) (Gilbert and Duchaine, 2009).

Il en ressort que les *Actinobacteria* sont plus présents dans les bioaérosols issus d'activités agricoles, tandis que pour les *Firmicutes* ainsi que les γ -*Proteobacteria* ils sont présents dans les bioaérosols des deux types d'activités mentionnées.

Concernant les champignons, le phylum *Ascomycota* domine au sein de ces activités. Les genres *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Penicillium* ont été identifiés au sein de chacun des bioaérosols présentés dans ce tableau.

TABLEAU 2.4 – Les principaux micro-organismes identifiés dans des bioaérosols issus d'activités agricoles ou industrielles (Gilbert and Duchaine, 2009)

Environnement		Bactéries		Champignons
Activités agricoles				
Porcherie	<i>Actinobacteria</i> <i>Firmicutes</i> γ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Actinomycetes</i> <i>Clostridia</i> <i>Bacteroidetes</i> <i>Lactobacillales-Streptococcales</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Moraxella</i> <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Cephalosporium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Faecilomyces</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Acremonium</i> <i>Trichoderma</i> , <i>Scopulariopsis</i>
Bovins engraissement	<i>Actinobacteria</i> <i>Firmicutes</i> γ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Corynebacterium</i> <i>Bacillus</i> , <i>Helococcus</i> <i>Yersinia</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Bipolaris</i> , <i>Chrysosporium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i>
Laiterie	<i>Actinobacteria</i>	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	<i>Ascomycota</i> <i>Basidiomycota</i>	<i>Aspergillus glaucus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Cladosporium</i> <i>Wallemia</i>
Poulaillers	<i>Firmicutes</i> γ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>Salmonella</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i>
Moissons	<i>Actinobacteria</i> <i>Firmicutes</i> γ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> <i>Corynebacterium</i> , <i>Streptomyces</i> <i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> <i>Pantoea</i> , <i>Arthrobacter</i> <i>Pseudomonas</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Penicillium</i> , <i>Alternaria</i> <i>Cladosporium</i> <i>Aspergillus candidus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i>
Ensilage maïs	<i>Firmicutes</i> β - <i>Proteobacteria</i> γ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Bacillus</i> <i>Alcaligenes</i> <i>Pseudomonas</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Citrobacter</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Penicillium</i>
Activités industrielles				
Traitement des eaux usées	<i>Firmicutes</i> γ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Thermoactinomyces</i> <i>Acinetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>Stenotrophomonas</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Alternaria</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Geotrichum</i>
Recyclage du papier	<i>Firmicutes</i> γ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Pseudomonas</i> , <i>Aerococcus</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Trichoderma</i> <i>Faecilomyces</i>
Scieries	<i>Actinobacteria</i> <i>Firmicutes</i> β - <i>Proteobacteria</i> γ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Corynebacteria</i> , <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> <i>Bacillus</i> , <i>Thermoactinomyces</i> <i>Alcaligenes</i> , <i>Rahnella</i> , <i>Pantoea</i> <i>Enterobacter</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Alternaria</i> , <i>Penicillium</i> <i>Eupenicillium</i> , <i>Trichoderma</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Exophiala</i> , <i>Faecilomyces</i> <i>Cladosporium</i>
Usines de textile	<i>Actinobacteria</i> <i>Firmicutes</i> γ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Brevibacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> <i>Bacillus</i> <i>Enterobacter</i> <i>Arthrobacter</i> , <i>Pantoea</i>	<i>Ascomycota</i> <i>Mucoromycotina</i>	<i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Penicillium</i> <i>Fusarium</i> , <i>Candida</i> <i>Mucor</i>

2.2.2 L'état physiologique des micro-organismes

Les micro-organismes peuvent être présents sous différents états physiologiques dans l'atmosphère.

2.2.2.1 La sporulation

Les spores sont une des formes de résistances des micro-organismes (bactéries Gram positif et champignons). Elles sont synthétisées lors de conditions environnementales défavorables. Elles sont résistantes à la température, la dessiccation mais aussi à des composés chimiques. Les spores peuvent germer lorsque les conditions redeviennent favorables. La germination nécessite une activation qui peut être induite par la lumière, la chaleur, le pH...

Les spores du fait de leur petite taille et de leurs résistances peuvent être des vecteurs de dissémination des micro-organismes dans l'air sur de longues distances (Kellogg and Griffin, 2006).

2.2.2.2 La viabilité

Jusqu'aux années 80, la mise en évidence d'une bactérie viable reposait sur sa capacité à se multiplier et à former des colonies ou non sur des milieux de culture (Roszack and Colwell, 1987). Mais la découverte de bactéries viables mais non cultivables (VBNC) a été faite dans les années 1980, remettant en cause cette notion de viabilité. En effet ces bactéries ne sont pas capables de croître sur des milieux de cultures en condition de laboratoire.

La viabilité cellulaire est aujourd'hui montrée en employant différentes approches recensées par la figure 2.1 (Keer and Birch, 2003).

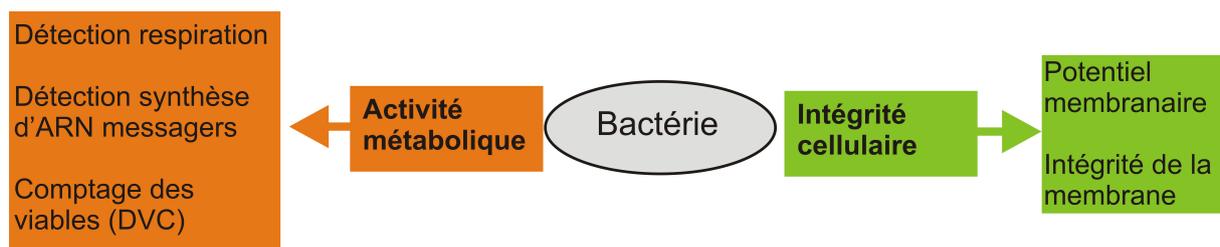


FIGURE 2.1 – Les différentes voies de détection des bactéries viables (Keer and Birch, 2003)

La technique la plus employée parmi celles présentées dans la figure 2.1 est celle du comptage des bactéries viables (DVC) (“Direct Viable Count”) (Kogure et al., 1978). Elle consiste à incuber les bactéries dans un milieu contenant un inhibiteur de la division cellulaire (par exemple la ciprofloxacine). Les cellules actives sont allongées permettant de les distinguer des cellules inactives sous observation microscopique (figure 2.2).

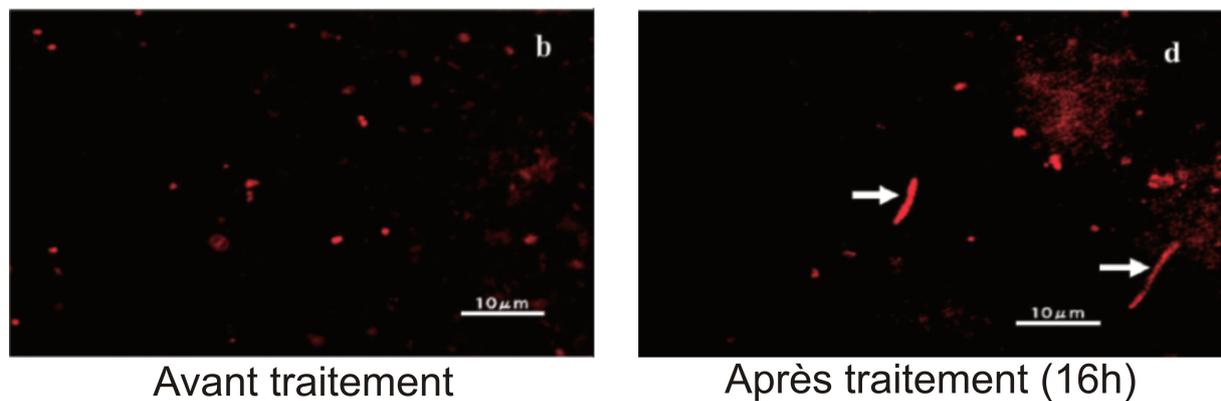


FIGURE 2.2 – Dénombrement des bactéries viables par la méthode DVC (technique couplée au FISH pour la détection d'*Escherichia coli*) La flèche indique une cellule qui s'est allongée (viable) (Wu et al., 2009)

Le passage dans cet état peut être induit par différents facteurs environnementaux (température, privation de nutriments, la concentration en oxygène...) (Oliver, 2005). Les stress qui sont connus pour induire le passage à l'état VBNC, sont rencontrés par les bactéries au sein de la matrice air. Cependant, l'état VBNC n'a pas été étudié spécifiquement dans les bioaérosols. Les différences entre le dénombrement par culture et par microscopie confirment néanmoins que dans l'air, une large proportion de bactéries sont viables mais non cultivables (Peccia and Hernandez, 2006). Néanmoins ces bactéries ainsi que d'autres micro-organismes peuvent s'être adaptés aux conditions régnantes dans l'atmosphère et être actifs.

2.2.2.3 L'activité des micro-organismes

Au sein des différentes couches de l'atmosphère, la température de l'air diminue en fonction de l'altitude (cf. figure 2.7), la température est négative à partir de 2 km et descend jusqu'à -50°C à 10 km (fin de la troposphère). Une classification des micro-organismes selon la température a été développée (tableau 2.5).

TABLEAU 2.5 – Classification des micro-organismes en fonction de la température

Classe	Température de développement en °C		
	Minimum	Optimum	Maximum
Psychrophiles	-10	10	20
Psychrotrophes	-10	25	35
Mésophiles	15	37	45
Thermophiles	45	68	80
Hyperthermophiles	70	95	110

Au regard des conditions régnant dans l'air, les micro-organismes psychrophiles et psychrotrophes paraissent les mieux adaptés à cet environnement. Les psychrophiles, qui ne peuvent se développer au delà de 20°C, ont été identifiés en Antarctique, dans les glaciers, les océans (Feller and Gerday, 2003; Morita, 1975).

Pour ces micro-organismes, le métabolisme cellulaire (les enzymes) et la structure membranaire doivent s'adapter aux faibles températures. Les enzymes psychrophiles sont plus actives que les mésophiles à une température de 15°C (Feller and Gerday, 2003; Georlette et al., 2004). Il est intéressant de voir que les enzymes psychrophiles réagissent plus rapidement en sachant que la température moyenne annuelle de l'air au niveau de l'eau est aux alentours de 15°C.

Une façon de savoir si les micro-organismes sont viables dans l'atmosphère, consiste à doser l'adénosine triphosphate (ATP). La concentration théorique en ATP dans une cellule bactérienne est de 3×10^{-6} pmol tandis que la concentration dans une spore fongique est de 3×10^{-5} pmol (Amato et al., 2007). Amato *et al.* ont relevé une concentration en ATP de 0,40 pmol mL⁻¹ d'eau de nuage. Ceci nous indique qu'au sein des nuages, il y a présence de micro-organismes actifs. Sattler *et al.* ont dénombré la présence de micro-organismes actifs dans les nuages par dosage de la thymidine. La concentration bactérienne viable y est de l'ordre de 1×10^3 bactéries mL⁻¹ (Sattler et al., 2001). La littérature concernant la mesure de la concentration d'ATP dans les bioaérosols est peu abondante, mais actuellement des systèmes de détection sont conçus pour mesurer directement l'ATP dans les bioaérosols (Lee et al., 2008; Seshadri et al., 2009).

Nous l'avons vu la température dans l'atmosphère est basse, ce qui permet de supposer que cette niche écologique est favorable aux micro-organismes psychrophiles. Effectivement dans l'air, des genres psychrophiles ont été identifiés mais ils ont également été

trouvés dans des environnements froids (glaciers, Antarctique, sol) : *Micrococcus*, *Aerococcus*, *Planococcus*, *Chryseobacterium*, *Pedobacter*, *Paracoccus*, *Acinetobacter* (Liu et al., 2000; Mannisto and Haggblom, 2006; Margesin et al., 2003; Polymenakou et al., 2008; Sheridan and Brenchley, 2000; Yamahira et al., 2008).

2.3 Dynamique temporelle et spatiale des bioaérosols

La concentration microbienne dans l'air peut varier au cours du temps. Dans cette partie, la variation saisonnière et à une échelle inférieure la variation nyctémérale vont être observées.

2.3.1 Variation temporelle

2.3.1.1 Variation saisonnière

La saison est un paramètre important dans l'émission des micro-organismes dans l'air. Généralement, c'est en hiver que l'on observe un minima aussi bien pour les bactéries que pour les champignons et le maximum a lieu durant le printemps pour les bactéries tandis que pour les champignons, le maximum est observé en automne (figure 2.3) (Jones and Harrison, 2004; Lighthart, 1997). Les variations observées ont été étudiées uniquement sur la fraction cultivable.

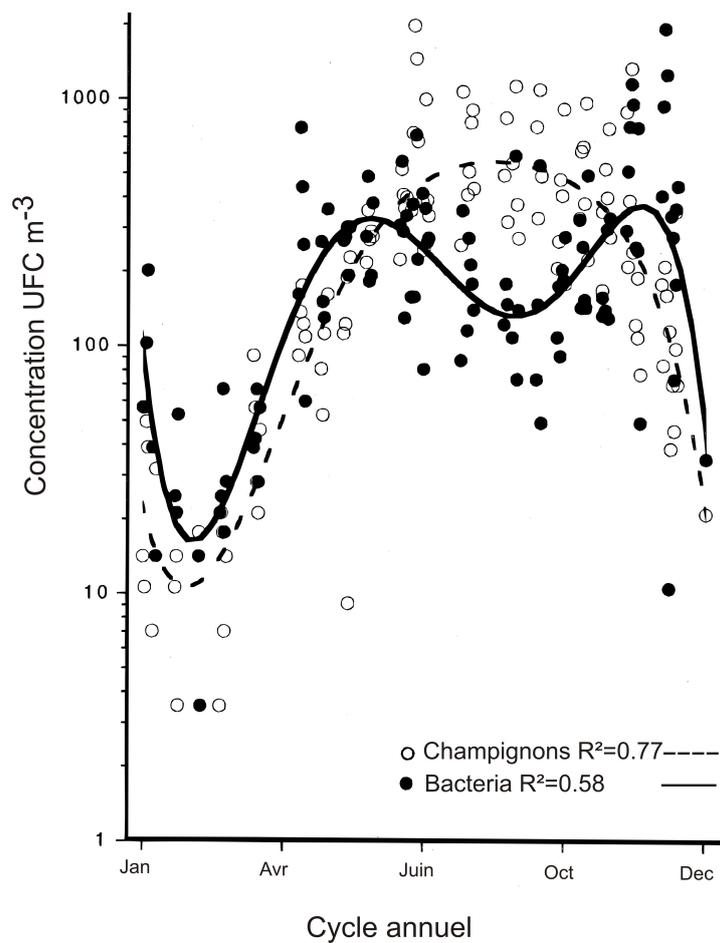


FIGURE 2.3 – Variation de la concentration bactérienne et fongique au cours de l'année. La méthode de collecte a été réalisée par impaction (collecteur Andersen) et le dénombrement par culture (Lighthart, 1997)

Concernant les champignons, l'étude de Herrero *et al.* porte sur la variation des certaines spores de champignon dans l'air de Madrid, Espagne. L'émission de spores a lieu toute l'année avec une augmentation au printemps et également en octobre (figure 2.4) (Herrero *et al.*, 2006).

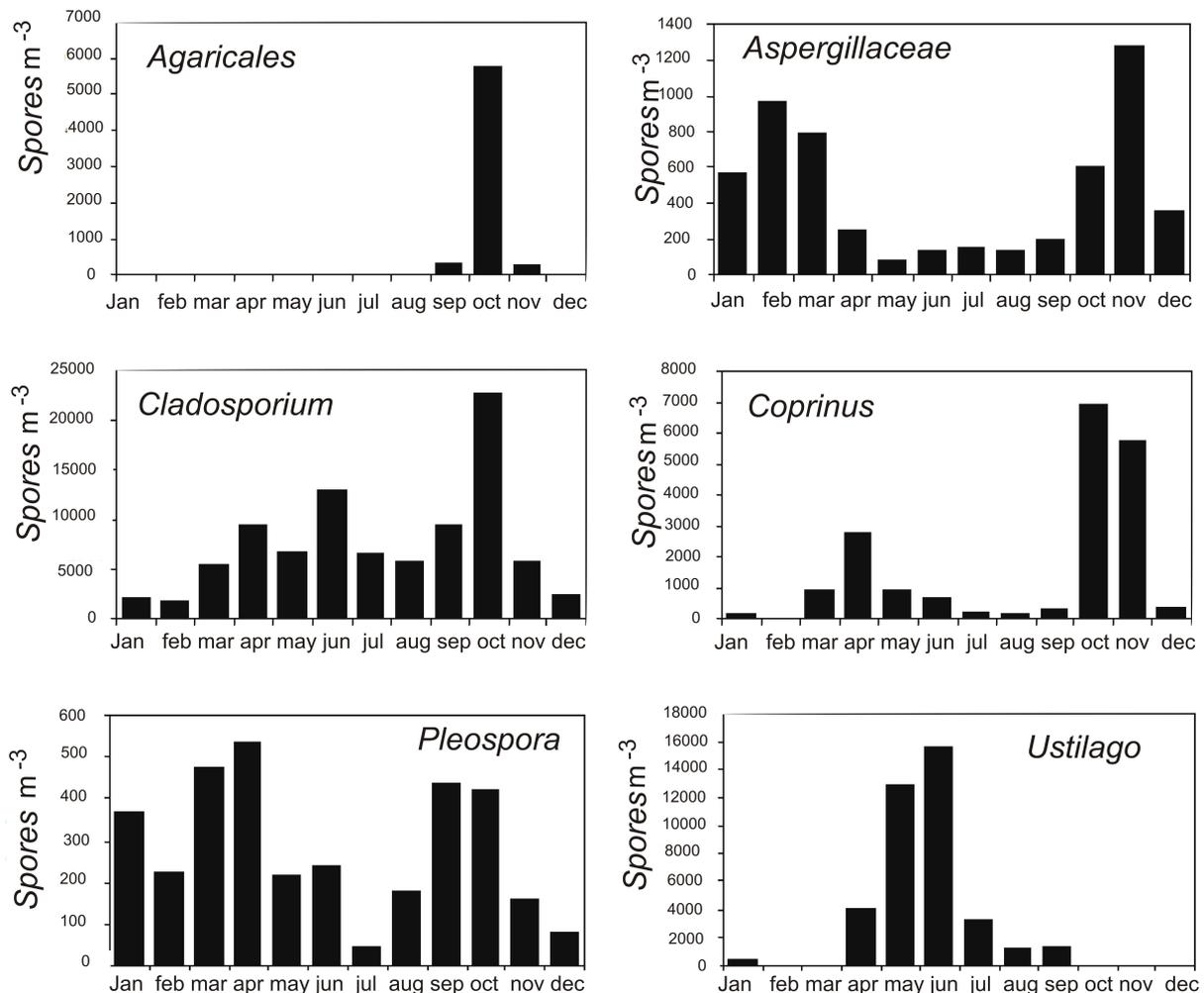


FIGURE 2.4 – Variations saisonnières de la concentration de spores aérosolisées de différents champignons (Herrero et al., 2006)

Deux émissions des spores sont observées :

- Les spores sont émises toute l’année (*Cladosporium*, *Aspergillaceae*, *Pleospora*) (Li and Kendrick, 1994) Pour les spores *Aspergillaceae*, l’émission serait bimodale (forte émission au printemps et en hiver).
- Les spores sont émises ponctuellement :
 - pendant une saison (printemps-été : *Ustilago* ; printemps-automne : *Coprinus*)
 - pendant un mois (émission au mois d’octobre pour *Agaricales*)

Katial *et al.* ont étudié les variations saisonnières de certains champignons (*Cladosporium*, *Alternaria* et *Epicoccum*) sur une période de 8 ans (Katial et al., 1997). Les résultats obtenus sont similaires à ceux de Herrero *et al.* Li *et al.* ont montré que durant la période estivale les espèces *Ganoderma*, *Leptosphaeria*, *Coprinus* et *Polythrincium* dominaient (Li and Kendrick, 1994).

La variation des micro-organismes dans l’air durant l’année provient majoritairement des sources et des paramètres météorologiques.

2.3.1.2 Variation nycthémérale

La variation nycthémérale est l'alternance jour/nuit. Il apparaît que d'après plusieurs études (Gregory, 1973 ; Lighthart and Kirilenko, 1998 ; Tong and Lighthart, 1999 ; Linderman et Upper 1985 ; Lighthart et Shaffer 1995) référencées dans (Burrows et al., 2009a,b), la concentration des micro-organismes fluctue avec cette alternance. La plus forte concentration est observée le jour comme l'indique la figure 2.5. Plusieurs échantillons d'air ont été collectés à différentes heures de la journée et analysés par une technique moléculaire (ARISA "Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis") (Maron et al., 2006). Une fluctuation de la concentration bactérienne présente dans l'air est recensée.

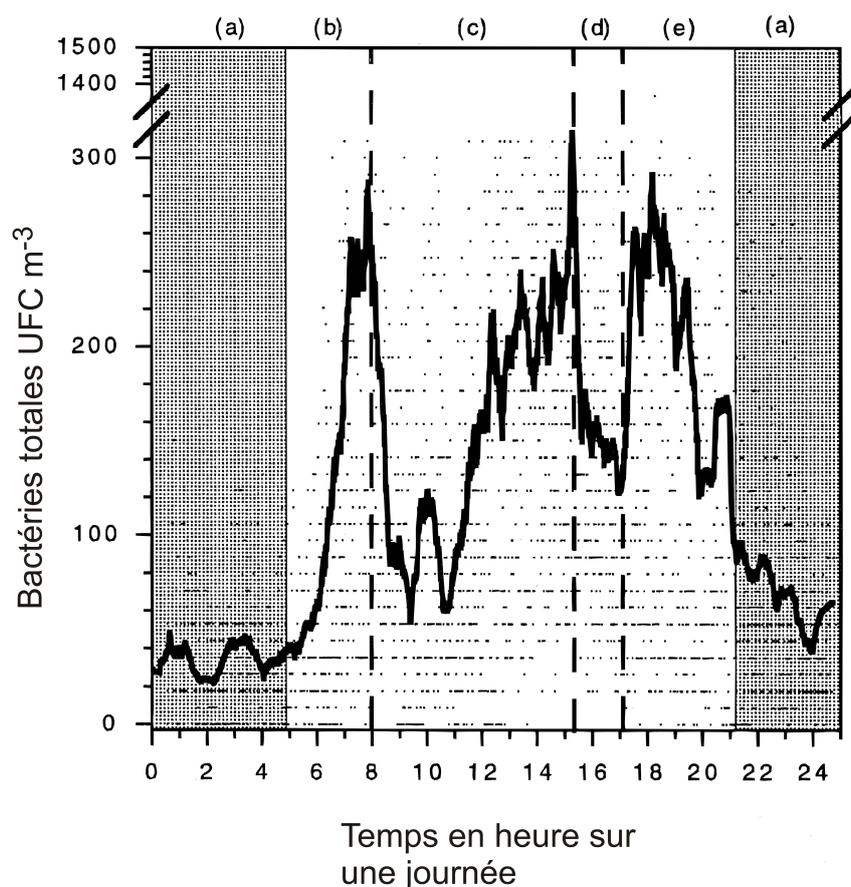


FIGURE 2.5 – Variation de la concentration bactérienne au cours d'une journée (Lighthart, 1997)

Cinq phases y sont décrites :

- (a) Concentration minimale durant la nuit
- (b) Pic de concentration à l'aube (6h-8h) peut être dû au réchauffement du sol
- (c) Second pic de concentration observé vers 14h-16h
- (d) Diminution de la concentration du fait de l'apparition du vent
- (e) Diminution pour atteindre le niveau nocturne

Pour les champignons, le tracé journalier est similaire (émission durant la journée). Les champignons émettent rapidement leurs spores, en seulement deux heures, un facteur

d'augmentation de 10 est observé (Burch et al., 2002). L'étude de Stepalska *et al.* porte sur la périodicité des concentrations des spores de champignons de *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Didymella* et *Ganoderma* (Stepalska and Wolek, 2009). Il en résulte quelles que soient les conditions météorologiques, les spores de *Cladosporium* sont émises dès la fin de la matinée avec un pic d'émission en début d'après-midi. L'émission continue toute l'après-midi. Concernant les spores de *Botrytis* l'émission a lieu en trois vagues : la première en fin de matinée, la seconde en fin d'après-midi et la dernière au cours de la nuit. Les spores d'*Alternaria* sont émises en début d'après-midi. Enfin les spores de *Ganoderma* et de *Didymella* sont émises en fin de nuit.

Les espèces *Cladosporium*, et *Alternaria* prédominent durant les jours secs dans la plupart des endroits en particulier en été. A l'inverse les espèces émettant les ascospores ou les basidiospores ont un mécanisme actif de relargage des spores (décrit précédemment), qui prédomine la nuit et après la pluie. Leur nombre atteint 1×10^6 spores m^{-3} quand le temps est favorable. Habituellement les concentrations sont de l'ordre de 10 à 1×10^3 spores m^{-3} (Deloraine et al., 2002). La concentration en spores dans une zone de référence (zone non soumise aux bioaérosols émis par une plate-forme de compostage) est inférieure à 1×10^3 spores. m^{-3} pour Bungler *et al.* (Bunger et al., 2000a,b). Les espèces affiliées au phylum *Ascomycota* émettent plus de spores quand l'humidité est élevée et quand la température est basse, ce qui suggère une émission nocturne (Burge, 1986; Li and Kendrick, 1994).

2.3.2 Variation spatiale

Le tableau 2.6 répertorie la concentration des micro-organismes (bactéries et/ou champignons) mesurée dans un échantillon d'air ayant soit une origine urbaine, soit rurale, soit marine. L'abondance des micro-organismes semblerait être similaire entre l'air urbain et rural (Harrison et al., 2005). L'air marin est le plus faiblement concentré des trois environnements.

TABLEAU 2.6 – Concentration des micro-organismes présents dans l’air de différents environnements

Environnements	Bactéries		Champignons UFC m ⁻³	Références
	totales ¹ cellules m ⁻³	cultivables UFC m ⁻³		
Urbain	$3,2 \times 10^3 - 1,7 \times 10^4$			Harrison et al. (2005)
Rural	$4,2 \times 10^3 - 1,6 \times 10^4$			Harrison et al. (2005)
Marin	$2,8 \times 10^3 - 1,4 \times 10^4$			Harrison et al. (2005)
Urbain			7 – $2,4 \times 10^3$	Lau et al. (2006)
Rural			50 – $1,5 \times 10^3$	Lau et al. (2006)
Urbain		80 – $2,8 \times 10^3$	6 – 560	Di Giorgio et al. (1996)
Marin		0 – 510	0 – 266	Di Giorgio et al. (1996)
Urbain		540 – 690		Shaffer et Lighthart (1997)
Marin		90 – 120		Shaffer et Lighthart (1997)
Rural		410 – 660		Shaffer et Lighthart (1997)
Rural		100 – 710		Shaffer et Lighthart (1997)

¹ Le dénombrement des bactéries totales a été obtenu par microscopie

2.3.3 Variation des concentrations microbiennes au sein de la colonne d’air

La première étude des bioaérosols dans la colonne d’air date de 1978, elle a été effectuée par Imshenetsky *et al.*. Ils ont mis en évidence par culture des micro-organismes collectés à 77 km d’altitude¹ (Imshenetsky et al., 1978). Depuis d’autres auteurs ont collecté des micro-organismes dans l’air à différentes altitudes puis les ont analysés par des méthodes culturales (Wainwright et al., 2003; Fulton and Mitchell, 1966; Fulton, 1966a,c,b; Timmons et al., 1966). Il en résulte une décroissance de la concentration avec l’augmentation de l’altitude. Plus récemment, la concentration des micro-organismes totaux (en supposant que 1% des micro-organismes présents dans les échantillons se développent) en fonction de l’altitude a été estimée et est représentée par la figure 2.6 (Yang et al., 2010).

1. correspondant à la mésosphère (couche de l’atmosphère, au dessus de la stratosphère, comprise entre 50 et 80 km d’altitude)

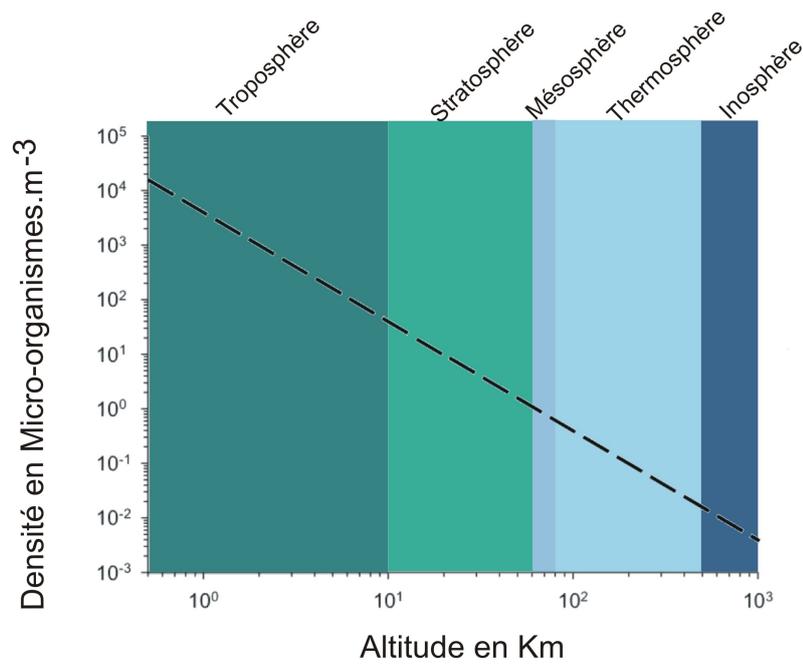


FIGURE 2.6 – Estimation de la densité microbienne en fonction de l'altitude d'après Yang *et al.*, 2010. L'équation de la droite de régression est $d = 4000/h^2$ d représente la densité microbienne et h la hauteur

En plus de ces variations, les paramètres météorologiques sont à prendre en compte. En effet ils ont une influence sur la survie des micro-organismes aérosolisés, leur dispersion (physique et biologique).

2.4 Les mécanismes de survie des micro-organismes

Les micro-organismes présents dans l'air sont soumis à de nombreux facteurs (température, humidité...). Ces différents facteurs peuvent induire des stress chez les micro-organismes et pour survivre, ils doivent s'adapter à ces nouvelles conditions, entraînant des réponses physiologiques. Dans cette partie, les différents facteurs environnementaux générant des stress relatifs à la survie dans l'air sont présentés ainsi que les réponses microbiennes à ces stress.

2.4.1 Les facteurs météorologiques

2.4.1.1 La température

C'est un des facteurs principaux pour la survie des micro-organismes aérosolisés. En effet la température agit directement sur le métabolisme microbien (vitesse de réaction des enzymes, fluidité des membranes...). La figure 2.7 indique la température régnant dans la troposphère. On observe que le gradient de température est important car on passe de 20°C au niveau de la mer à -51°C en limite de troposphère.

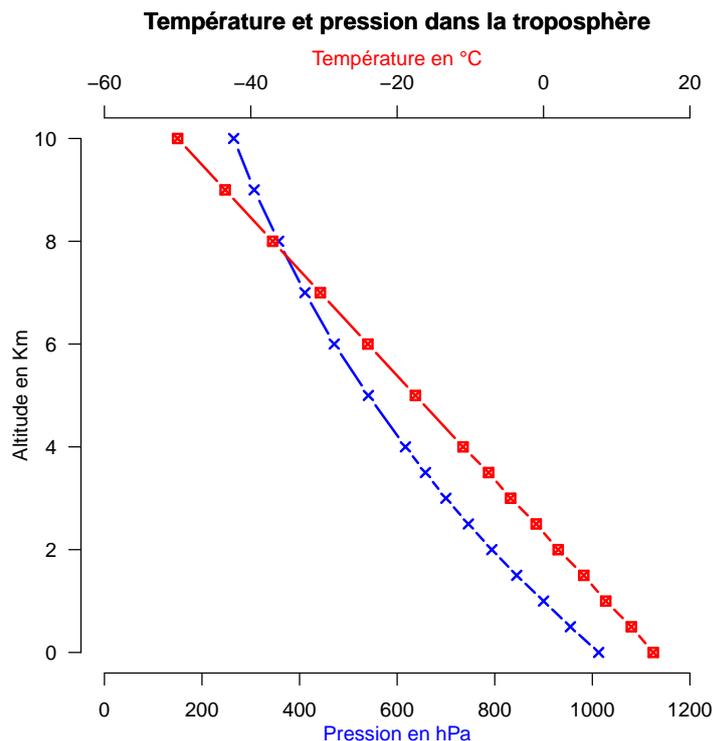


FIGURE 2.7 – Variation de la température (■) et de la pression dans la troposphère (×)

La température est corrélée avec de nombreux facteurs climatiques qui peuvent affecter les micro-organismes présents dans l'atmosphère (par exemple corrélation négative avec l'humidité (Li and Kendrick, 1994)). De nombreux auteurs ont constaté que la température était corrélée positivement avec la concentration bactérienne, c'est à dire que la concentration bactérienne augmente avec la température (Bovallius et al., 1978; Harrison et al., 2005; Jones and Harrison, 2004; Lighthart et al., 2004). Cette relation est également vraie pour les champignons (Adhikari et al., 2006; Burch et al., 2002; Katial et al., 1997).

Les micro-organismes aérosolisés sont soumis aux basses températures présentes dans l'atmosphère (figure 2.7). Ce stress est l'un des facteurs les plus limitant de la présence de micro-organismes viables. La réponse cellulaire à ce stress thermique est la production de protéines du froid ("cold-shock") (Graumann and Marahiel, 1998). Ces protéines sont présentes chez de nombreuses bactéries et champignons. Elles permettent de maintenir l'activité cellulaire aux basses températures.

Un changement de la composition membranaire s'opère également aux basses températures afin d'augmenter la viscosité dans les membranes. Ceci s'effectue notamment par l'augmentation de liposaccharides et par la réduction des chaînes des acides gras (Chintalapati et al., 2004; Laybourn-Parry, 2002). Une autre réponse face aux froids est la présence de pigments, principalement les caroténoïdes ainsi que leurs dérivés. Ces pigments sont présents dans la membrane, et la stabilisent. Plus la température est basse, plus la concentration des pigments augmente (Fong et al., 2001).

Les micro-organismes possèdent des cryoprotecteurs (Cleland et al., 2004). La glycine bêtaïne (synthétisée à partir de la choline) est un osmorégulateur et également un cryoprotecteur. L'activation de la glycine bêtaïne s'effectue à une température comprise entre 10 et 15°C et entraîne une modification de la composition en acide gras au sein de la membrane permettant de maintenir une fluidité (Ozcan et al., 2007). Marthi *et al.* se sont intéressés à l'effet que la bêtaïne peut avoir sur les bactéries aérosolisées provenant d'une station d'épuration des eaux usées et d'une exploitation agricole. Ils ont montré que l'ajout de bêtaïne dans le milieu de culture permettait un meilleur développement des colonies des micro-organismes aérosolisés (Marthi and Lighthart, 1990).

2.4.1.2 L'humidité relative

L'humidité relative correspond au rapport entre la quantité de vapeur d'eau présente dans un échantillon d'air sur la quantité maximale qu'il peut contenir à une température et une pression données.

L'humidité joue un rôle dans la survie des micro-organismes présents dans l'air. La modification du taux d'humidité dans l'air peut provoquer des modifications de conformation de la membrane et des protéines des micro-organismes et ainsi diminuer sa viabilité (Israel and Lighthart, 1993). La protection mise en œuvre consiste à accumuler dans les cellules des osmorégulateurs comme la bêtaïne, la proline, le tréhalose... (Kempf and Bremer, 1998). Ces osmorégulateurs sont présents chez les bactéries et les champignons mais aussi les invertébrés et les végétaux.

En 2001, Peccia *et al.*, ont montré à l'aide de la microscopie et des méthodes culturales que les bactéries absorbent l'eau présente dans l'atmosphère et que ceci permet une protection face aux ultra-violets (Peccia and Hernandez, 2006).

Les bactéries produisant des exopolysaccharides se protègent d'un stress hydrique. En effet les exopolysaccharides peuvent retenir l'eau, si les conditions sont défavorables ils peuvent former un gel autour de la cellule (Chataigné, 2007).

Le vent assèche les masses d'air entraînant un stress hydrique pour les micro-organismes, dont les mécanismes de réponse ont été présentés.

Pour les bactéries, selon certaines études, le taux d'humidité a un effet positif sur leur aérosolisation, (Burch et al., 2002; Katial et al., 1997; Lighthart et al., 2004), alors que d'autres (Mouli et al., 2005), ne trouvent pas de corrélation entre le taux d'humidité et l'aérosolisation bactérienne.

Walter *et al.* ont aérosolisé deux espèces *Pseudomonas syringae* et *Erwinia herbicola* sous conditions contrôlées en température et en humidité relative (Walter et al., 1990). Ils ont mis en évidence l'influence des conditions température/humidité relative lors de l'aérosolisation de ces micro-organismes. La survie de *Pseudomonas syringae* aérosolisé à une température de 12°C avec 80% d'humidité est 35 à 65 fois supérieure qu'à une température de 27°C pour une humidité de 40%.

2.4.2 Les radiations

Les radiations électromagnétiques correspondent aux rayons X, aux rayons γ et aux rayons ultra-violet. Ces derniers génèrent des lésions au sein du matériel génétique des micro-organismes (figure 2.8) (Mohr, 1997). Le rayonnement UV au niveau de la mer varie entre 80 et 200 W m^{-2} selon la présence ou l'absence d'une couverture nuageuse.

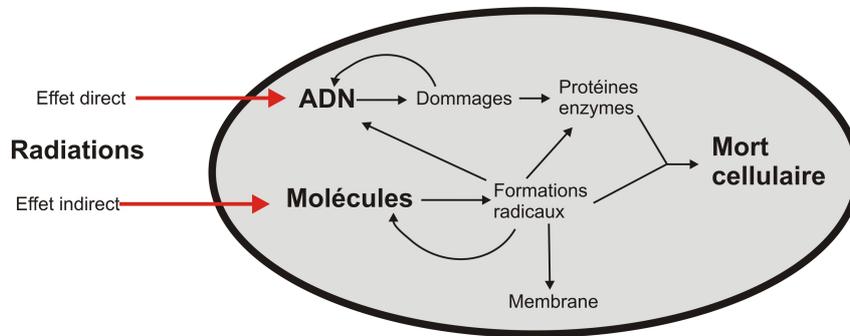


FIGURE 2.8 – Effets des radiations sur les micro-organismes

Le rayonnement solaire induit une perte de la cultivabilité et de viabilité (passage des micro-organismes en VBNC) des micro-organismes (Tong and Lighthart, 1997). Dans leur étude sur la survie dans les océans, Agugé *et al.* ont montré que la résistance au rayonnement solaire dépend de l'espèce bactérienne (Agogue et al., 2005). Les espèces les plus résistantes, *Pseudomonas* et *Alteromonas*, sont affiliées au groupe des γ -*Proteobacteria*. Certains micro-organismes se sont adaptés face aux rayonnements en augmentant la concentration de pigments (jaune, rouge, orange) durant la journée. Les radiations entraînent une diminution de la survie des bactéries totales (pigmentées et non pigmentées), par contre les bactéries pigmentées se développent (Tong and Lighthart, 1997). Pour ces auteurs, ils semblent qu'il y ait une relation inverse entre la survie des bactéries totales et les bactéries pigmentées.

Le genre *Deinococcus* est particulier car c'est le seul micro-organisme capable de résister aux rayons γ . L'espèce *Deinococcus radiodurans* est multi résistante : dessiccation, rayonnements UV, rayonnements γ et peroxyde d'hydrogène (Venkateswaran et al., 2000).

2.4.3 Les nutriments présents dans l'atmosphère

Dans l'étude de Vaitilingom *et al.*, ils ont recueilli des bactéries présentes dans l'air (nuages) et les ont cultivées avec un milieu de culture contenant les concentrations des nutriments mesurées dans l'air. Les nutriments présents dans l'atmosphère, et plus précisément dans les nuages (eau atmosphérique) sont référencés dans le tableau 2.7 (Vaitilingom et al., 2010). Actuellement, c'est la seule étude qui montrent que certains micro-organismes prélevés dans l'air se développent en utilisant comme substrat les nutriments identifiés dans l'air.

TABLEAU 2.7 – Les principaux composés organiques retrouvés dans les nuages (Puy de Dôme 2001-2008) (Vaitilingom et al., 2010)

Composés	Concentration dans les nuages en μM	
	minimale	maximale
Acétate	0,31	48
Formate	0,25	70
Succinate	0,02	4
Oxalate	0,10	7
Nitrate	0,80	766
Sulfate	1,94	370
Ammonium	6,28	$1,8 \times 10^3$

Certains de ces composés présents dans les nuages interviendrait dans les différents cycles métaboliques et donc pourrait servir de substrat aux micro-organismes. L'acétate, le succinate ainsi que le fumarate sont des voies d'entrées pour le cycle de Krebs mais également dans d'autres voies de synthèse.

Sattler *et al.* indiquaient la présence de micro-organismes viables dans les nuages utilisant comme nutriments en plus des composés précédemment cités des alcools (dodecanol, tetradecanol, hexadecanol, octadecanol ainsi que des alcools à longues chaînes (C12-C18)) (Sattler et al., 2001).

Nous l'avons vu, les micro-organismes présents dans l'air subissent de nombreux stress, limitant leur développement, néanmoins, certains sont capables de résister et se maintenir dans cet environnement. Parmi ces micro-organismes, certains peuvent avoir des effets potentiels sur la santé des hommes.

2.5 Les impacts sanitaires associés aux bioaérosols

Au sein du bioaérosol des micro-organismes pathogènes ainsi que leurs métabolites secondaires peuvent avoir un effet sur la santé humaine. Les mécanismes d'action employés sont de deux ordres :

- un mécanisme infectieux
- un mécanisme allergique et ou inflammatoire

Il faut savoir que chaque jour une personne respire environ 14m^3 d'air. La respiration ainsi que l'ingestion sont les principales voies d'entrée des agents infectieux dans l'organisme. Les hommes émettent en permanence des bioaérosols lors d'une discussion, d'une toux, d'une desquamation. Lors d'un éternuement entre 4×10^4 et 2×10^6 particules

sont émises dont 80% ont une taille comprise entre 10 et 100 μm (Duguid, 1946) (figure 2.9). Même lorsque les hommes sont immobiles, chaque minute, 1×10^6 particules d'un diamètre supérieur à 0,3 μm sont émises. Lors d'un déplacement à 3 km h^{-1} , la quantité d'émission des particules est de 5×10^6 (Renoux and Boulaud, 1998).

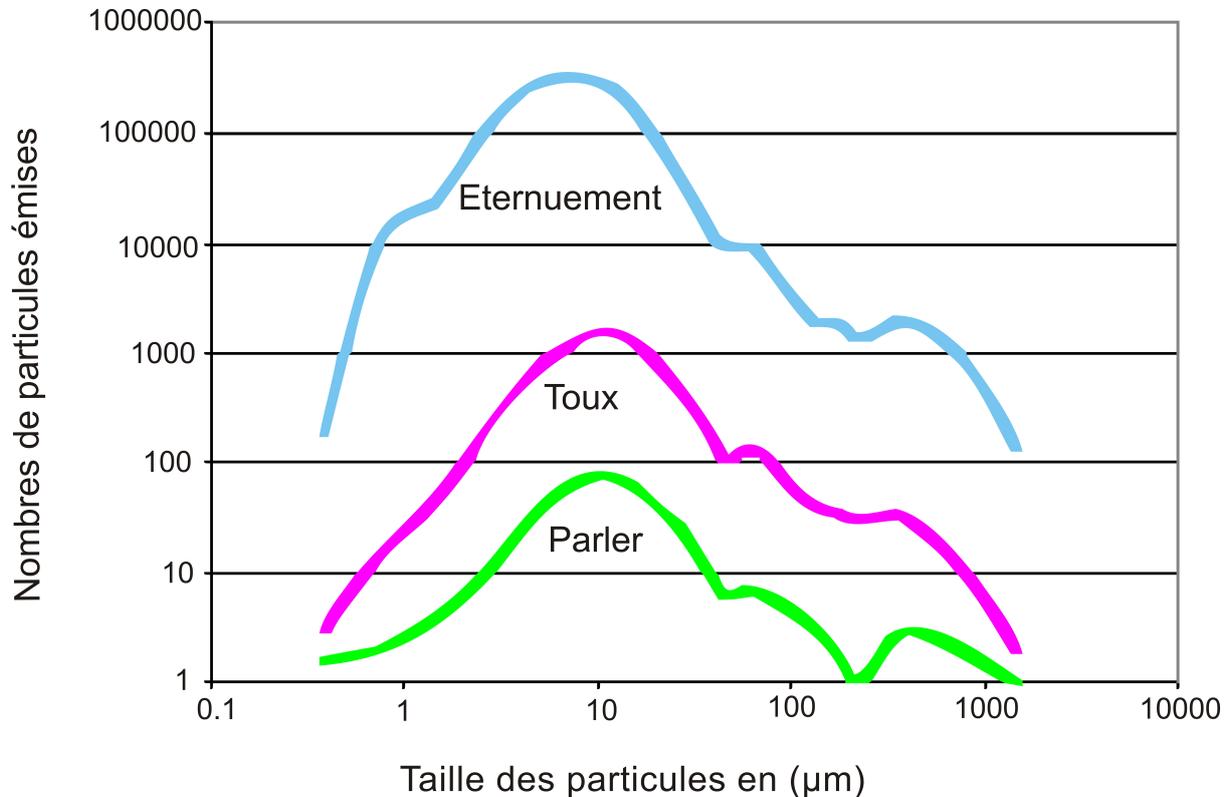


FIGURE 2.9 – Concentrations en particules aérosolisées par l'homme (Cloutier, 2007)

2.5.1 La réaction infectieuse

2.5.1.1 La transmission

L'air constitue une voie de transmission des micro-organismes avec l'eau, les aliments, les animaux... La transmission peut s'effectuer via l'intermédiaire de poussières ou de gouttelettes d'eau.

2.5.1.2 L'inhalation

La taille de la particule joue également un rôle. En effet selon la taille, la particule inhalée pénétrera plus ou moins profondément au sein de l'arbre respiratoire. En France, le code du travail (articles R.4222-3 et R.4222-10) définit la taille des particules pouvant pénétrer dans les différentes régions de l'arbre respiratoire. Seules les particules inférieures à 100 μm sont prises en compte comme risque d'inhalation pour les travailleurs. Les différentes classes sont :

- Particules ayant un diamètre compris entre 5 et 30 μm , la pénétration s'arrête au niveau de la région naso-pharyngée.

- Particules ayant un diamètre compris entre 1 et 5 μm , la dépose s'effectuera au niveau de la région trachéo-bronchique.
- Pour les particules ayant un diamètre inférieur à 1 μm , la pénétration ira jusqu'au compartiment alvéolaire.

La figure 2.10 représente les différents compartiments de l'arbre respiratoire et la pénétration de différentes tailles de particules.

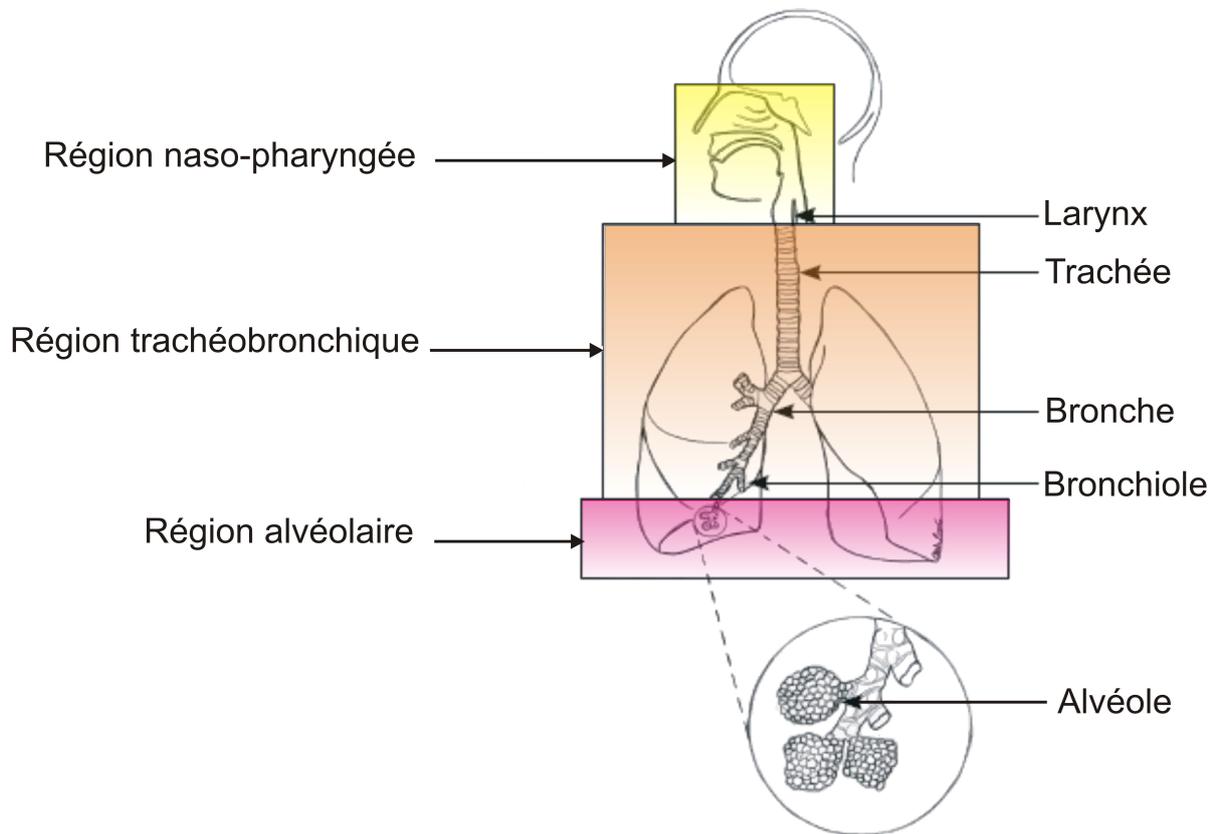


FIGURE 2.10 – Arbre respiratoire de l'homme. Le dépôt des particules selon la taille est représentée : en jaune 5-30 μm , en orange 1-5 μm et en mauve < à 1 μm

Le tableau 2.8 répertorie les symptômes que peuvent engendrer certains micro-organismes ou leurs métabolites secondaires lorsqu'ils sont inhalés.

TABLEAU 2.8 – Les effets sanitaires potentiels des principaux micro-organismes aérosolisés ou de leurs métabolites

Types de micro-organismes et métabolites secondaires	Exposition	Réaction
Actinomycètes	inhalation	allergique : rhinite, BAAE ¹
<i>Aspergillus fumigatus</i>	inhalation	infectieuse (aspergillose) allergique
Endotoxines	inhalation	inflammation (seuil 10 ng m ⁻³) ODTS ² (seuil 200 ng m ⁻³) asthme (seuil 100 ng m ⁻³)
Mycotoxines	inhalation	cancérogène potentiellement cancérogène
(1→3)-β-D-glucanes	inhalation	mal connue sensibilité respiratoire

¹ Bronchoalvéolite allergique extrinsèque

² Syndrome toxique des poussières organiques

2.5.1.3 La dose infectante

L'inoculum inhalé est généralement faiblement concentré pour provoquer des maladies sans passer par une phase de multiplication. Afin que l'infection se déclare, il faut que le nombre de micro-organismes dépasse un seuil. Ce seuil est variable d'une personne à l'autre, selon si elle est immuno-déprimée, malade ou saine.

2.5.2 La réaction allergique et ou inflammatoire

L'allergie est définie comme : "la capacité d'un individu à réagir de manière différente lors d'un second contact avec un antigène. La notion d'hypersensibilité spécifique fait référence à une réaction immunitaire exacerbée ou inappropriée". Des facteurs génétiques (prédisposition), ainsi qu'une exposition à des allergènes peuvent entraîner une réaction allergique.

La réaction inflammatoire est un type de mécanisme général de défense de l'organisme (vasodilatation des vaisseaux sanguins, apport et activation de protéines et libération de

médiateurs).

Les réactions allergiques ou inflammatoires diffèrent d'un individu à l'autre selon qu'il est prédisposé ou non. De nombreux micro-organismes ainsi que leurs métabolites peuvent entraîner une hypersensibilité.

2.5.2.1 La broncho-pneumopathie obstructive

Il s'agit de bronchite chronique ou d'emphysème. Ce syndrome a en particulier été décrit chez les ouvriers des silos à grains et dans les élevages de porcs et de volailles.

2.5.2.2 Le syndrome toxique de la poussière organique

Ce type de pathologie regroupe tous les cas de mycotoxicoses pulmonaires allant du poumon du fermier, aux fièvres d'inhalation, et les fièvres des travailleurs du textile (RECORD, 2008). Le syndrome toxique de la poussière organique, ODTS ("Organic Dust toxic Syndrom"), est observé après une forte exposition à de fines poussières (diamètre < 5 µm). La présence d'endotoxines, d'*Aspergillus fumigatus* et de *Penicillium* serait responsable de cette pathologie. Les ODTS s'observent principalement chez les travailleurs nouvellement embauchés (RECORD, 2008).

2.5.2.3 La pneumonie d'hypersensibilité

Ce type d'allergie est également connue sous le nom d'alvéolite allergique extrinsèque. Elle est liée à l'inhalation d'actinomycètes thermophiles et de champignons comme *Aspergillus*, *Penicillium* . . . (De Lucca, 2007). Les formes de pneumopathies d'hypersensibilité évoluent plus ou moins brutalement vers une insuffisance respiratoire. Les troubles disparaissent en général si l'exposition cesse. A chaque nouvelle exposition, les symptômes peuvent réapparaître et évoluer vers une atteinte pulmonaire irréversible. La forme chronique surviendrait surtout chez les sujets continuellement exposés à de petites doses de façon régulière (RECORD, 2008).

2.5.2.4 L'asthme professionnel

Il est défini comme des asthmes induits de façon spécifique par l'exposition répétée à des agents présents dans le milieu professionnel. Le contact avec des bioaérosols peut engendrer de l'asthme pour les travailleurs. Cette maladie touchant les bronches entraîne une gêne respiratoire. Plus de 400 agents différents ont été rapportés comme cause possible de l'asthme professionnel et de nouvelles étiologies ne cessent d'apparaître. Les moisissures et les champignons sont les principaux agents microbiologiques incriminés (RECORD, 2008).

2.5.3 Les toxines

2.5.3.1 Les mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires des champignons composés d'ami-noacides et de terpènes. Ce sont des composés stables à la chaleur. Les champignons produisant le plus de mycotoxines sont les *Aspergillus*, *Trichotecium*, *Penicillium*, *Fusarium* . . . (Perdrix et al., 1997). Il faut noter qu'à l'intérieur d'une même espèce, toutes les souches ne sont pas toxigènes.

Il existe plus de 600 mycotoxines connues mais toutes n'ont pas la même toxicité. Les principales mycotoxines sont :

- Les aflatoxines sont produites principalement par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*, elles ont une large distribution et un haut pouvoir contaminant par voie orale.
- Les trichotécènes regroupent plusieurs dizaines de mycotoxines différentes produites par de nombreuses espèces fongiques dont les *Fusarium* (les principales sont la toxine T2, le désoxynivalénol et le nivalénol) (De Lucca, 2007). On les trouve principalement dans les cultures : le maïs, le blé et l'orge.
- Les ochratoxines sont produites principalement par *Aspergillus* (*Aspergillus ochraceus*. . .) et *Penicillium* (*Penicillium viridicatum*. . .), la plus toxique est l'ochratoxine A, trouvée dans le maïs, l'orge, le blé, le café. . . (Perdrix et al., 1997).
- les fumonisines sont produites par *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides*. Elles sont cytotoxiques pour les cellules des mammifères (De Lucca, 2007) et sont présentes dans le maïs.

L'aflatoxine B1 est classée dans la catégorie effet cancérigène certain pour l'homme, tandis que l'ochratoxine A, l'aflatoxine M1, la griséofulvine, la fumonisine B1 et l'acide penicillique sont classées dans la catégorie potentiellement cancérigène.

2.5.3.2 Les glucanes

Ce sont des polysaccharides issus des parois cellulaires des plantes (avoine), des champignons et de certaines bactéries (*Actinomyces*, *Streptomyces*). Les glucanes ayant des effets immunobiologiques puissants sont les (1→3)- β -D-glucanes.

2.5.3.3 Les endotoxines

Elles sont présentes dans la paroi des bactéries Gram négatif. La destruction ou la multiplication des bactéries libèrent les endotoxines qui deviennent actives (Miller, 1994). Elles n'ont pas d'action spécifique et ont un pouvoir antigénique faible. Les effets varient selon la concentration inhalée, bénéfique à faible dose (stimule la prolifération des cellules du système immunitaire, principalement les lymphocytes B (Gery et al., 1972) et néfaste à plus forte concentration (Delaunay, 1997; Perdrix et al., 1997). Les endotoxines sont

formées d'un complexe de liposaccharide (LPS) responsable de la plupart des effets, il agit par des mécanismes inflammatoires mais aussi toxiques et immunologiques. La partie lipidique (lipide A) des endotoxines est la cause de la majorité des propriétés toxiques (Rylander and Jacobs, 1994). Les endotoxines ont été identifiées dans les poussières organiques présentes dans les usines de compostage.

2.5.4 Les études épidémiologiques

2.5.4.1 Etudes épidémiologiques dans les industries

Le tableau 2.9 issu d'une synthèse de Poulsen (Poulsen et al., 1995), rassemble les principales études épidémiologiques réalisées dans les industries. Les principaux symptômes respiratoires observés dans les différents milieux industriels sont principalement dus aux endotoxines.

TABLEAU 2.9 – Etudes épidémiologiques dans les milieux industriels autres que les procédés de dépollution, (Poulsen et al., 1995)

Sources	Population	Symptômes	Agents impliqués	Auteurs
Filature de coton				
	445	Byssinose ¹ Problèmes respiratoires	Endotoxines	Sigsgaard et al., 1992
	882	Problèmes respiratoires Bronchite chronique	Endotoxines	Kennedy et al., 1987
	248	Byssinose ¹	Bactérie Gram négatif	Haglund et al., 1981
	720	Pas de relation	Endotoxines Bactéries Champignons	Cinkotai et al., 1977
	108 sessions de 24-35	Problèmes respiratoires	Endotoxines	Castellan et al., 1987
	13 sessions de 15	Byssinose Problèmes respiratoires	Endotoxines	Rylander et al., (1987)
	107 sessions de 23	Problèmes respiratoires	Endotoxines	Haglund et Rylander (1984)
Porcherie				
	57	Problèmes respiratoires	Endotoxines	Donham et al., 1990
	62	Problèmes respiratoires	Endotoxines	Heederick et al., 1991
		Pas de relation	Bactérie Gram négatif	
		Pas de relation	Bactéries	
Eleavage de volaille				
	47	Problèmes respiratoires	Endotoxines	Theilm et al., 1984
Usine de nourriture animale				
	440	Problèmes respiratoires	Endotoxines	Smid et al., 1992
Sciure				
	47	Problèmes respiratoires	Champignons	Dahlqvist et al., 1992
	473	Problèmes respiratoires	Champignons	Eduard et al., 1993
		Irritation des muqueuses	Champignons	
		ODTS ²	Champignons	

¹ maladie respiratoire professionnelle dans l'industrie cotonnière équivalent à l'asthme² Syndrome toxique des poussières organiques

2.5.4.2 Etudes épidémiologiques dans les procédés de dépollution en milieu professionnel

Le tableau 2.10 présente les différentes pathologies retrouvées dans la filière de traitement des déchets.

TABLEAU 2.10 – Récapitulatif des différentes études épidémiologiques au sein du milieu professionnel

Sources	Population	Symptômes	Agents impliqués	Auteurs
Plate-forme de compostage Mélange OM ¹ et boues de STEP	13	Fièvre, céphalées irritation oculaire diarrhées	Suspicion Endotoxines Bactérie Gram négatif	Lundholm and Rylander, 1980
Mélange boues de STEP et DV	107	Irritation oculaire Irritation nasale Infections des oreilles Infections cutanées	<i>Aspergillus</i> Bactérie Gram négatif Endotoxines	Clark et al., 1984
Compost	8	Asthme Bronchite chronique Toux Irritation des yeux Irritation du nez	Micro-organismes	Sigsgaard et al. 1994
Compost	22	Problèmes respiratoires Problèmes cutanés Bronchite Sinusite ODTS ²	Champignons Actinomycètes	Bunger et al., 2000
Compost individuel	1 paysagiste	BAAE ³	<i>Aspergillus</i>	Weber et al., 1993
Centre de tri papier	20	Bronchite chronique Toux Irritation des yeux Irritation du nez Rhinorée ⁴ Irritation de la gorge	Micro-organismes	Sigsgaard et al. 1994
Centre de tri déchets	44	Problèmes respiratoires Irritation oculaire Irritation de la gorge Irritation du nez Problèmes respiratoires Toux Bronchite chronique	Micro-organismes Endotoxines	Sigsgaard et al. 1994

¹ Ordures ménagères

² Syndrome toxique des poussières organiques

³ Bronchoalvéolite allergique extrinsèque

⁴ Ecoulement nasal

Une étude parue en 2009 recense toutes les études épidémiologiques réalisées sur les procédés de dépollution (centre de stockage des déchets ultimes, incinérateurs, collecte des ordures ménagères et du compostage) (Porta et al., 2009).

Sur la période 1983-2008, quarante-neuf études sont effectuées dont trente-deux concernent les risques sanitaires des riverains et seulement dix-sept concernent les travailleurs. Sachant qu'une grande majorité des études est en relation avec les incinérateurs et les centres de stockage des déchets ultimes.

Concernant les plates-formes de compostage, seulement deux études sont rapportées pour les travailleurs (Bunger et al., 2000a,b, 2007). Elles ont été réalisées en Allemagne, en 2000 Bunger *et al.* ont montré que les travailleurs sur les plates-formes de compostage présentaient plus de maladies cutanées et pulmonaires que la population témoin.

La seconde étude qu'ils ont effectuée en 2007 sur quarante et une plates-formes de compostage consistait en une étude sur l'exposition à long terme des travailleurs face aux poussières. L'évaluation a consisté en un questionnaire standardisé, un examen clinique et des mesures spirométriques. Il en ressort que sur six des quarante et un sites de

compostage, une prévalence d'irritation des muqueuses oculaires et des voies respiratoires supérieures est observée chez les travailleurs par rapport au groupe témoin. Des cas de conjonctivite sont fréquemment diagnostiqués chez les travailleurs. Les auteurs concluent sur le fait que l'exposition aux poussières organiques sur les plates-formes de compostage est associée à des effets respiratoires aigus et chroniques, incluant des irritations des muqueuses, des bronchites chroniques et un déclin accéléré du volume expiratoire.

2.5.4.3 Etudes épidémiologiques auprès des riverains

Actuellement, il existe peu d'études, seulement cinq, sur le risque des riverains des sites de compostage, pour trois d'entre elles (Browne et al., 2001; Cobb et al., 1995), les résultats sont non significatifs. C'est à dire qu'il n'y a pas de différence qui a été mise en évidence entre les riverains d'une plate-forme de compostage et le groupe témoin. Les deux dernières Douves *et al.* (2000) et Herr *et al.* (2003) ont montré qu'il y avait une augmentation des inflammations respiratoires (bronchites, essoufflements), des tremblements, de douleur aux yeux (Douwes et al., 2003; Douwes and Wouters, 2000; Herr et al., 2003).

Herr *et al.* ont comparé une zone résidentielle témoin avec une zone proche d'un site de compostage, qu'il a divisé en trois zones (150 – 200 m ; 200 – 400 m ; 400 – 500 m). Il en ressort que pour la zone 150 – 200 m, il y a une augmentation des éternuements et une fatigue des yeux (Herr et al., 2003). Dans tous les cas il est très difficile d'établir un lien de causalité entre les émissions d'un site de compostage et les effets sur les riverains.

Dans ce chapitre consacré à la composition microbienne dans l'atmosphère, il en ressort que cette composition varie en permanence au cours de la journée mais également selon les masses d'air analysées (urbaines, rurales, côtières). Pour les champignons, l'émission de spores vers l'atmosphère est variable au cours de l'année selon les espèces. Cette émission est régie par les paramètres environnementaux telles que la température et l'humidité. Ce phénomène de saisonnalité n'est pas observé chez les bactéries.

Au sein du bioaérosol présent dans l'atmosphère, toutes les études montrent une forte dominance du phylum *Proteobacteria* (α , β et γ).

Maintenant que nous connaissons la diversité microbienne de l'air dans différents environnements, observons la diversité des bioaérosols émis lors du traitement des déchets.

Bioaérosols émis lors des procédés de dépollution

Sommaire

3.1	Introduction	99
3.2	Les centres de stockage	99
3.2.1	Principe de fonctionnement	99
3.2.2	Concentration et communauté microbienne des bioaérosols	100
3.2.3	Dispersion des bioaérosols	103
3.3	Les stations d'épuration	105
3.3.1	Principe de fonctionnement	105
3.3.2	Le bioaérosol émis en fonction des étapes du traitement	105
3.3.3	La dispersion des bioaérosols de stations d'épuration	110
3.4	La digestion anaérobie	111
3.4.1	Principe de fonctionnement	111
3.4.2	La composition des bioaérosols formés dans les méthaniseurs	112
3.5	L'épandage	114
3.5.1	Généralités	114
3.5.2	Dispersion du bioaérosol émis lors de l'épandage de boues de stations d'épuration	115
3.5.3	Caractérisation du bioaérosol émis lors de l'épandage de boues de station d'épuration	116
3.6	Le compostage	119
3.6.1	Définition	119
3.6.2	Les plates-formes de compostage	119
3.6.2.1	Les différentes étapes du procédé	120
3.6.2.2	Diversité microbienne au sein du compost	125
3.6.2.3	Caractérisation des bioaérosols de compostage	133

3.7	Réglementation française associée aux émissions atmosphériques des procédés de dépollution	148
3.7.1	Les centres de stockage des déchets ultimes	149
3.7.2	Les plates-formes de compostage	149
3.7.3	Les valeurs guides pour les bioaérosols	152

3.1 Introduction

Les procédés biologiques de dépollution sont basés sur l'utilisation du potentiel microbien de transformation de la matière organique. La diversité microbienne va être différente d'un procédé à l'autre. Au sein d'un même procédé, selon l'évolution du traitement, la dynamique de la communauté microbienne va être modifiée. Comme la diversité change au cours du traitement, le bioaérosol émis change également. Les bioaérosols émis sur les procédés de dépollution sont de natures différentes d'un procédé à l'autre et évoluent au cours du traitement. De manière générale, la concentration de particules aérosolisées est dépendante à la fois de la nature des déchets, des méthodes de travail et des conditions météorologiques.

3.2 Les centres de stockage

3.2.1 Principe de fonctionnement

Il y a quelques années, la mise en décharge était considérée comme un moyen bon marché pour se débarrasser des ordures et avait une image négative. Depuis la filière a subi des modifications notamment d'un point de vue réglementaire. Le stockage des déchets est la dernière étape de la filière de traitement car il reste un résidu émis, nommé déchet ultime, qui doit être stocké.

En France, il existe trois types de centre de stockage des déchets ultimes (CSDU) :

- CSDU 1 : soumis à la réglementation des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE), accueillant les déchets industriels dangereux tel que le refus d'incinération des ordures ménagères (REFIOM)
- CSDU 2 : accueillant les déchets ménagers et assimilés.
- CSDU 3 : accueillant les déchets dits inertes (matériaux de construction, gravats. .).

La figure 3.1 présente les différentes caractéristiques d'un centre de stockage.

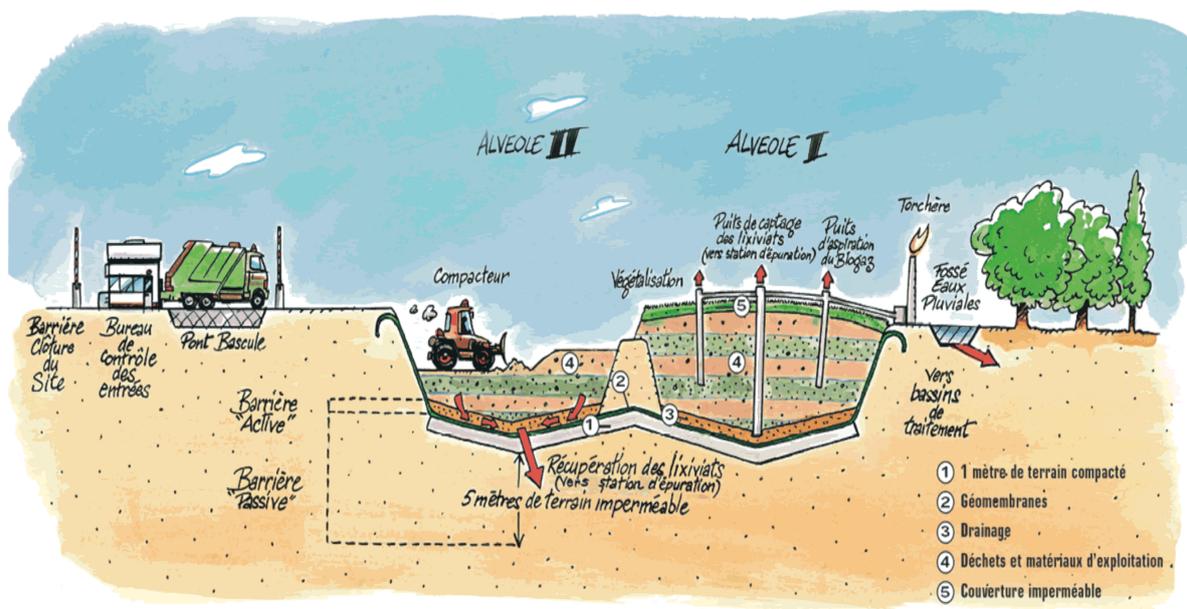


FIGURE 3.1 – Principe d'un centre de stockage de déchets ultimes (<http://www.biltagarbi.fr>)

3.2.2 Concentration et communauté microbienne des bioaérosols

Au sein d'un centre de stockage, les zones d'émissions des bioaérosols sont observées lors du déversement des déchets dans les casiers et également lors du travail du chargeur. Le biogaz est également une source d'émission mais la réglementation implique que le biogaz soit collecté (cf. paragraphe 3.7 réglementation française associée aux émissions atmosphériques).

Concernant la diversité microbienne aérosolisée d'un centre de stockage de déchets ultimes, peu d'études ont été réalisées (Rahkonen *et al.*, 1987 ; Rahkonen *et al.*, 1990 ; Reinthaler *et al.*, 1999 ; Réseau Santé Déchets, 2000) présentes dans (Delaunay, 1997 ; Huang *et al.*, 2002) et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 3.1. Pour ces cinq études, la méthode de collecte des bioaérosols employée est celle de l'impaction. Le dénombrement des micro-organismes a été réalisée par culture.

TABLEAU 3.1: Concentrations des micro-organismes dans les bio-aérosols provenant de centre de stockage des déchets ultimes

Activités	Bactéries totales UFC m ⁻³	Champignons totaux UFC m ⁻³	Micro-organismes identifiés	Endotoxines (ng m ⁻³)	Références
5 Centres de stockage sur un casier	moy ¹ : 500 (hiver)	moy : 3,8 × 10 ³ (hiver) max : 2,9 × 10 ⁴ (hiver)	Actinomycètes Entérocoques <i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i> <i>Penicillium</i>		Rahkonen <i>et al.</i> , 1987
2 Centres de stockage sur un casier	min : 400 max : 1 × 10 ⁵	min : 700 max : 3 × 10 ⁴	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Enterobacter sp.</i> <i>Bacillus sp.</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. niger</i> <i>Cladosporium</i> <i>Acronomium</i> <i>Fusarium</i>	min : 0,4 max : 29 moy : 5,3	Rahkonen <i>et al.</i> , 1990
1 Centre de stockage OM ² émissions à la source	min : 670 max : 4,3 × 10 ⁴ med ³ : 6,1 × 10 ³	min : 500 max : 5 × 10 ³ med : 1,3 × 10 ³	<i>A. fumigatus</i>		Reinthaler <i>et al.</i> , 1999

Activités	Bactéries totales UFC m ⁻³	Champignons totaux UFC m ⁻³	Micro-organismes identifiés	Endotoxines ng m ⁻³	Références
2 Centres de stockage OM	réception : 2 à 7 × 10 ³ alvéole : 2 × 10 ⁴ à 1,8 × 10 ⁵	réception : 200 à 3,5 × 10 ³ alvéole : 400 à 2 × 10 ⁴	Gram positif Gram négatif	min : 0,13 max : 1,1	RSD ⁴ , 2000
3 points de collecte	biogaz : 1,5 × 10 ³ à 1,7 × 10 ⁵	biogaz : 2 × 10 ³ à 4 × 10 ⁴	<i>A. fumigatus</i> <i>Penicillium</i>		
Casier fermé suivi sur 3 ans	1998 ⁵ moy : 3 × 10 ³ 1999 ⁶ moy : 2 × 10 ³ 2000 ⁷ moy : 2,4 × 10 ³	1998 ⁵ moy : 1 × 10 ⁴ 1999 ⁶ moy : 1 × 10 ⁴ 2000 ⁷ moy : 1,4 × 10 ⁴	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Cladosporium</i> <i>Alternaria</i> <i>Paecilomyces</i> <i>Fusarium</i> <i>Curvularia</i>		Huang <i>et al.</i> , 2002
Casier en cours de fermeture suivi sur 3 ans	1998 ⁵ moy : 4 × 10 ³ 1999 ⁶ moy : 2,6 × 10 ³ 2000 ⁷ moy : 5,5 × 10 ³	1998 ⁵ moy : 5 × 10 ³ 1999 ⁶ moy : 6,7 × 10 ³ 2000 ⁷ moy : 6,8 × 10 ³	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Cladosporium</i> <i>Alternaria</i> <i>Paecilomyces</i> <i>Fusarium</i> <i>Curvularia</i>		Huang <i>et al.</i> , 2002

1 moyenne; 2 Ordures ménagères; 3 médiane; 4 Réseau Santé Déchets; 5 moyenne des valeurs printemps, été, automne

6 moyenne des valeurs hiver, printemps, été; 7 moyenne des valeurs été, automne

La concentration bactérienne, mesurée par ces cinq études, présente dans les bioaérosols émis par les différents centres de stockage est de l'ordre de 1×10^3 UFC m^{-3} , tandis que pour les champignons elle est de 1×10^4 UFC m^{-3} . Les genres fongiques identifiés dans les différentes études sont *Aspergillus* et *Penicillium*.

Huang *et al.* ont collecté des bioaérosols sur une période de trois ans dans deux décharges dont une était fermée (présence d'une couverture de terre sur les casiers) et l'autre était en cours de fermeture (préparation en vue de recouvrir le casier). Peu de différence de concentration microbienne entre les deux casiers est observée (1×10^3 pour les bactéries, pour les champignons différence d'une unité logarithmique). La concentration microbienne fluctue peu au cours des trois années pour les deux types de casiers (Huang et al., 2002).

Ce qu'il ressort de ce tableau, c'est qu'il y a peu d'études qui se sont intéressées aux bioaérosols générés dans les centres de stockage. La concentration bactérienne et fongique est supérieure à 1×10^3 UFC m^{-3} et les genres fongiques *Aspergillus* et *Penicillium* ont été identifiés.

L'étude réalisée par le RSD (Réseau Santé Déchets) présentée dans le tableau 3.1 montre une prédominance de bactéries Gram négatif (*Pasteurella pneumotropica*, *Ochrobactrum anthropi*, *Stenothromonas maltophilia*) dans le biogaz alors qu'au niveau d'une alvéole en exploitation c'est une dominance des bactéries Gram positif qui sont aérosolisées. Pour les champignons, les concentrations les plus fortes sont retrouvées dans le biogaz et lors de l'exploitation d'une alvéole avec une dominance d'*Aspergillus fumigatus* et de *Penicillium*. Lors d'un déchargement de camion dans l'alvéole, la concentration en bactéries a atteint 1×10^5 UFC m^{-3} .

Dans le biogaz, la concentration en bactéries totales est comprise entre 2×10^3 et $1,2 \times 10^4$ UFC m^{-3} . La concentration en bactéries Gram négatif atteint 1×10^3 UFC m^{-3} .

Le fait de brasser les lixiviats dans la lagune est également une source d'aérosolisation des micro-organismes, notamment les bactéries Gram négatif qui sont retrouvées à une concentration de l'ordre de $1,5 \times 10^3 - 8,4 \times 10^3$ UFC m^{-3} .

Huang *et al.* ont observé que les genres dominant présents dans les bioaérosols émis par les deux types de casier sont *Aspergillus*, *Penicillium* et *Cladosporium*. Les genres *Cladosporium* et *Alternaria* sont plus présents dans le bioaérosol émis par le casier fermé que par celui du casier en cours de fermeture, différence d'une unité logarithmique. Une hypothèse qui peut l'expliquer : les casiers fermés sont recouverts de terre puis végétalisés (arbres, herbes). Ces deux genres fongiques sont présents sur les végétaux (pathogènes).

3.2.3 Dispersion des bioaérosols

Les auteurs, ayant réalisés l'étude pour le RSD en 2000, se sont intéressés à l'exposition des riverains face aux bioaérosols émis par les centres de stockage. Lorsqu'il n'y a pas d'activité sur le site, la concentration bactérienne en aval, sous les vents dominants, à une distance comprise entre 100 et 400 m est de l'ordre de 200 UFC m^{-3} et la concentration

des champignons est comprise entre 500 et $1,3 \times 10^3$ UFC m^{-3} .

Les concentrations bactériennes en aval sont supérieures à celles mesurées en amont du centre qui est de 37 UFC m^{-3} . Lors d'un déchargement d'un camion dans le centre, la concentration fongique à 100 m en aval est de 9×10^3 UFC m^{-3} .

Au cours de cette étude seuls les micro-organismes viables et cultivables ont été dénombrés, ce qui sous estime la concentration présente dans les bioaérosols émis des centres de stockage. Le tableau 3.2 synthétise les données obtenues pour les micro-organismes aérosolisés et se dispersant dans l'environnement des centres de stockage.

TABLEAU 3.2 – Concentrations bactériennes et fongiques aux alentours des centres de stockage

Distance	Bactéries totales UFC m^{-3}	Distance	Champignons UFC m^{-3}	Références
En amont du site	37			RSD, 2000
En aval du site 100 – 400 m	< 200	100 m 85 m	$500 - 1,3 \times 10^3$ 722 <i>Aspergillus fumigatus</i>	
En aval du site déchargement camion-benne		100 m	9×10^3	
450 m	$35 - 2,7 \times 10^3$ med ¹ : 280	450 m	$500 - 4,1 \times 10^3$ med : $1,4 \times 10^3$	Reinthalier et al.,1999

¹ médiane

3.3 Les stations d'épuration

3.3.1 Principe de fonctionnement

Il existe plusieurs types de stations d'épuration des eaux usées : stations à boues activées, biofiltres, stations physico-chimiques... En France, les stations d'épurations utilisant le procédé des boues activées sont les principales et ce sont également celles pour lesquelles les émissions de bioaérosols sont les plus étudiées. C'est pourquoi dans cette section seulement ce procédé sera présenté. Une station d'épuration des eaux usées par traitement des boues activées est constituée de différents niveaux de traitement (pré-traitement, primaire, secondaire (biologique) et tertiaire) comme l'indique la figure 3.2.

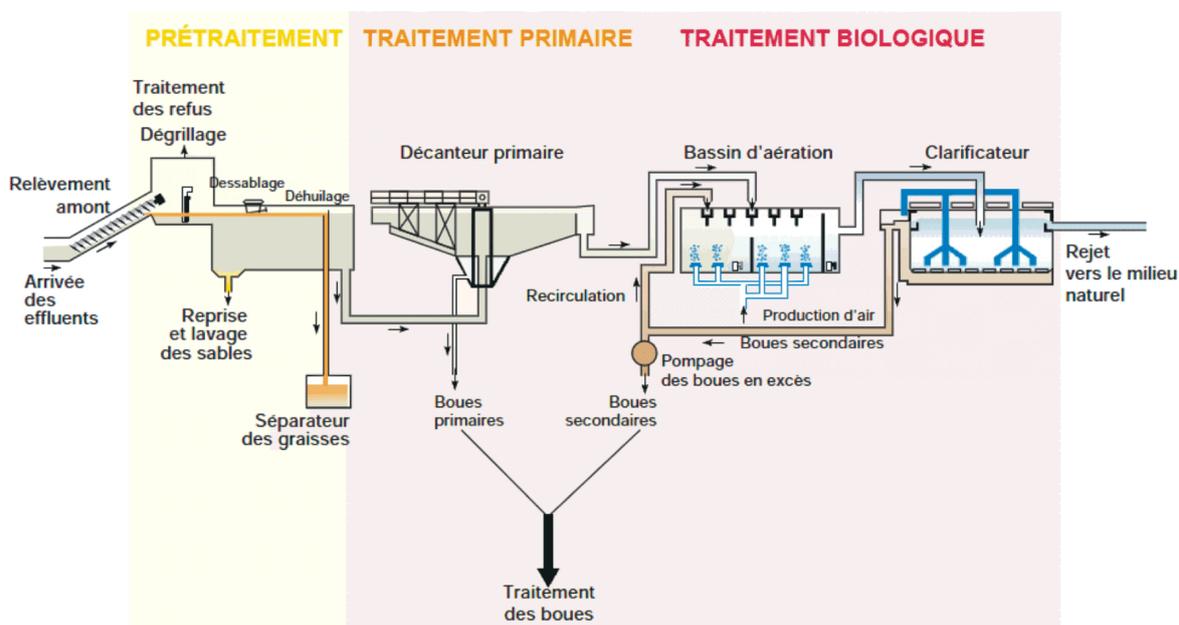


FIGURE 3.2 – Schéma d'une station d'épuration des eaux usées employant le traitement par les boues activées (Aussel et al., 2004)

3.3.2 Le bioaérosol émis en fonction des étapes du traitement

L'aérosolisation des micro-organismes a lieu en différents points de la station lors du procédé de traitement (figure 3.3). Mais elle peut également s'effectuer lors d'opérations de maintenance (nettoyage...). Le mécanisme d'aérosolisation dans les différents bassins est similaire à celui des environnements aquatiques, c'est à dire à la formation de bulles (cf. chapitre 1 mécanisme d'aérosolisation). Dans les bassins d'aération, l'air est insufflé par le fond créant ainsi un chapelet de bulles.

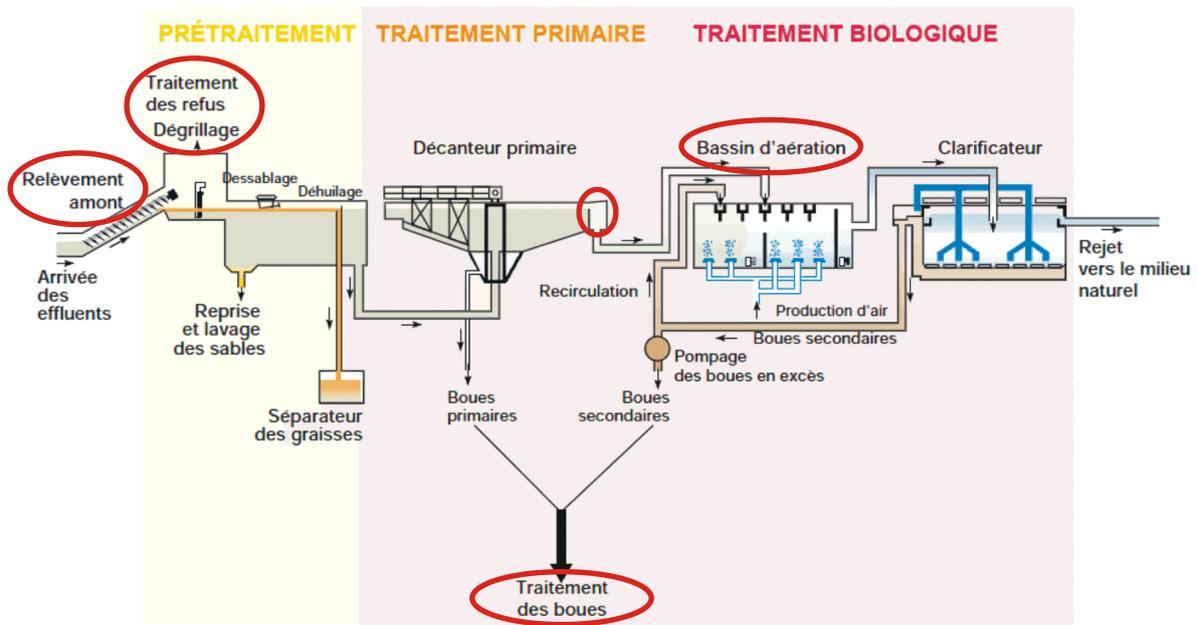


FIGURE 3.3 – Les différents lieux d'aérosolisation des micro-organismes au sein d'une station d'épuration

Dans diverses études la concentration des micro-organismes dans l'air lors des différentes phases du procédé d'épuration a été mesurée. Il en ressort que les phases de traitement où les concentrations dans l'air sont les plus importantes sont : (figure 3.4)

- lors de la phase de pré-traitement
- lors de la phase du traitement biologique
- lors de la phase de dénitrification (quand ceci est réalisé)
- lors de la phase d'épaississement des boues

La collecte des micro-organismes dans les bioaérosols émis par les six stations d'épuration a été réalisée par impaction et le dénombrement des bactéries mésophiles a été effectué par culture (Sanchez-Monedero et al., 2008). La figure 3.4 présente les concentrations des bactéries mésophiles dans l'air environnant les différentes étapes du procédé de traitement (pré-traitement, décantation, traitement biologique ...) pour les six stations d'épuration. Les valeurs obtenues sur les différentes étapes de la filière de traitement sont comparées avec le bruit de fond de l'air mesuré en amont des différents sites (distance en amont du site entre 25 et 100 m). On observe que certaines étapes induisent une augmentation de la concentration bactérienne dans l'air sur la plupart des stations d'épuration. C'est le cas du pré-traitement et du traitement biologique (5 stations sur 6). Par contre la phase d'épaississement des boues est significativement différente du bruit de fond de l'air pour deux stations sur les cinq effectuant cette opération de traitement.

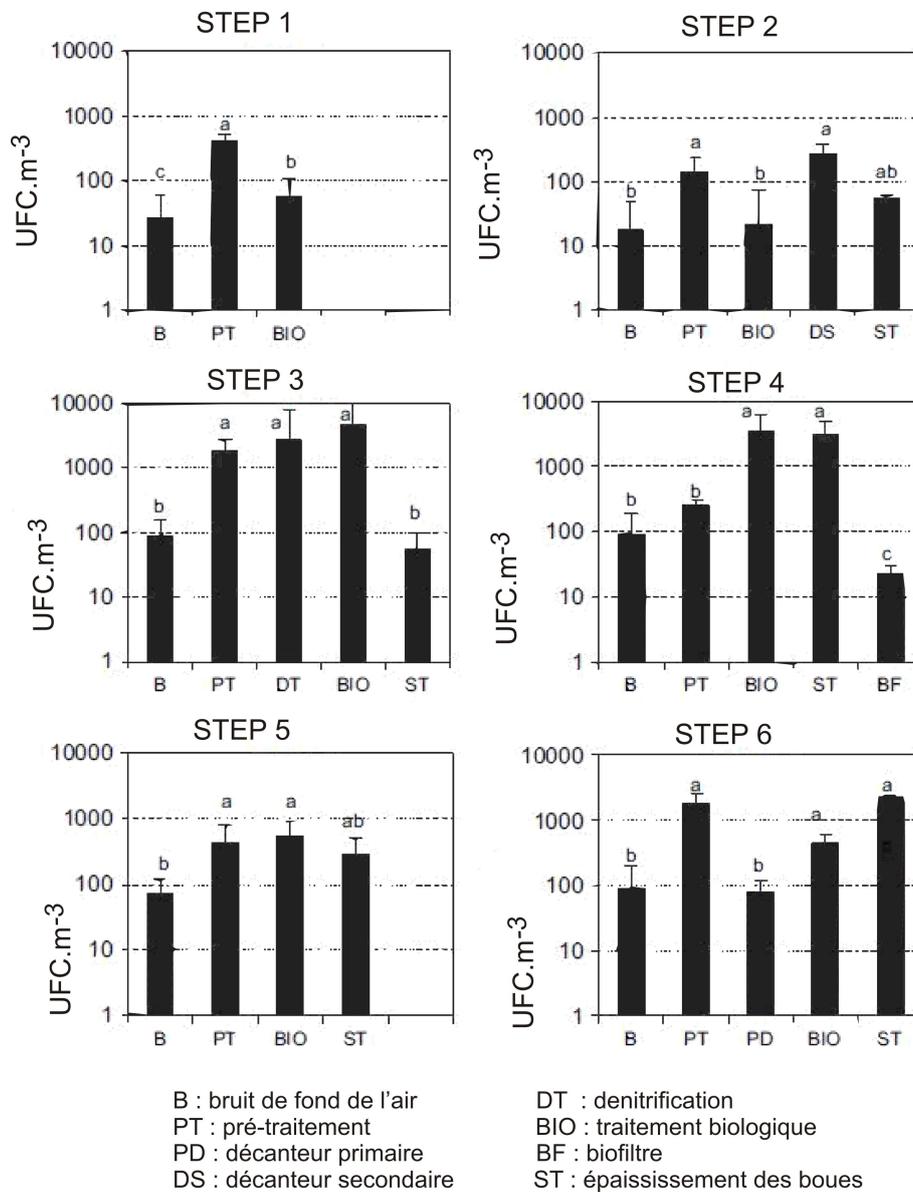


FIGURE 3.4 – Concentration dans l'air des bactéries mésophiles lors du traitement des eaux usées sur 6 stations d'épuration (STEP) (Sanchez-Monedero et al., 2008). Les lettres a, b et c indiquent qu'il n'y a pas de différence significative d'après le test de Duncan $p < 0,05$

D'autres auteurs ont également comparé les niveaux de micro-organismes dans l'air en fonction des différentes étapes du procédé. La plus forte concentration de micro-organismes aérosolisés est située dans la phase de pré-traitement (Heinonen-Tanski et al., 2009; Karra and Katsivela, 2007; Marchand et al., 1995; Sanchez-Monedero et al., 2008; Schlosser and Loret, 2005).

Certains auteurs (Heinonen-Tanski et al., 2009; Karra and Katsivela, 2007; Sanchez-Monedero et al., 2008) ont observé une décroissance de la concentration du bioaérosol au fur et à mesure de l'avancement du traitement des eaux usées. Lors de l'épaississement des boues les concentrations augmentent.

Concernant les bassins aérés, différents résultats sont observés, pour certaines stations d'épuration la concentration de l'émission de micro-organismes est similaire à celle du pré-traitement tandis que pour d'autres cette concentration diminue (Heinonen-Tanski et al., 2009; Sanchez-Monedero et al., 2008).

La quantité de bioaérosol émis par les stations d'épuration est variable du fait des différences entre les stations qui sont (Karra and Katsivela, 2007; Korzeniewska et al., 2009; Sanchez-Monedero et al., 2008) : le dimensionnement de la station (capacité de traitement), la composition des eaux usées entrantes (urbaines, semi urbaines, industrielles . . .), le procédé de dépollution employé et la méthode d'aération employée. Dans les bassins d'aération, Sanchez-Monedero *et al.* (2008) ont étudié les différents procédés utilisés et ont montré que l'action mécanique (avec un rotor) émettait plus de bioaérosol que le fait d'effectuer un bullage.

Marchand *et al.* ont recherché par les méthodes culturales la concentration des champignons dont *Aspergillus fumigatus*, des bactéries dont les bactéries Gram négatif et les endotoxines tout le long du procédé de traitement des effluents papetiers (tableau 3.3) (Marchand et al., 1995). Il en ressort que la concentration moyenne des champignons y est stable (1×10^3 UFC m^{-3}). Pour les bactéries, les concentrations sont de l'ordre de 1×10^3 UFC m^{-3} sur les différentes phases de traitement sauf lors de la phase de refroidissement, augmentation d'une unité logarithmique. La phase de refroidissement permet d'abaisser la température de l'eau aux alentours de $30^\circ C$, ceci permet le développement des bactéries totales ainsi que des bactéries Gram négatif. Lors de la déshydratation des boues, la concentration d'*Aspergillus fumigatus* augmente de deux unités logarithmiques.

TABLEAU 3.3 – Concentration moyenne des micro-organismes et des endotoxines lors des différentes phases du traitement des effluents papetiers (Marchard *et al.*, 1995)

Lieu	Champignons UFC m ⁻³ totaux	<i>Aspergillus fumigatus</i> UFC m ⁻³	Bactéries UFC m ⁻³ totales	Bactéries UFC m ⁻³ Gram négatif	Endotoxines UE ¹ m ⁻³
Eaux usées					
Pré-traitement	$2,4 \times 10^3$	510	$2,8 \times 10^3$	75	20
Bassin primaire	$1,7 \times 10^3$	360	$2,4 \times 10^3$	15	660
Refroidissement ²	$1,9 \times 10^3$	180	$1,1 \times 10^4$	340	13
Aération	$1,9 \times 10^3$	490	3×10^3	15	27
Bassin secondaire	$1,5 \times 10^3$	30	$2,1 \times 10^3$	35	11
Boues					
Déshydratation	$1,9 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$7,8 \times 10^3$	nd ³	820
Chargement	$2,4 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	nd	11

¹ unité d'endotoxine (10 UE correspondent à 1 ng d'endotoxine)

² phase de refroidissement de l'eau à 30°C pour permettre le développement des micro-organismes

³ nd non déterminé

3.3.3 La dispersion des bioaérosols de stations d'épuration

Les bioaérosols émis par les différentes étapes du procédé de traitement peuvent se disperser aux alentours de la station d'épuration. Brandi *et al.* (2000) se sont intéressés à l'émission microbienne d'un bassin de traitement des eaux usées en cours de démarrage. Une mesure de la concentration en amont (2 m) de la source a été effectuée avant toute activité sur le site. En aval de la source d'émission, deux points de collecte ont été réalisés (2 et 20 m) (Brandi *et al.*, 2000). Un suivi temporel de la concentration microbienne (de 1 à 25 jours) a été fait pour les différents points de collecte correspondant à une montée en charge du procédé de traitement. Les différents paramètres analysés sont les bactéries totales, les champignons totaux, les coliformes, les entérocoques, *Escherichia coli* et le genre *Staphylococcus*.

Avant toute activité sur le site, les valeurs de concentration pour les bactéries totales et pour les champignons sont similaires à celle du bruit de fond de l'air ($< 80 \text{ UFC m}^{-3}$ pour les bactéries et aux alentours de 250 UFC m^{-3} pour les champignons). Les autres paramètres ne sont pas détectés. Lorsque le procédé est démarré, une augmentation des différents paramètres est observée dans les bioaérosols générés. Les concentrations des bactéries totales, des champignons totaux, des coliformes et des entérocoques sont les mêmes pour les deux points en aval de la source d'émission. Au bout de 25 jours, la concentration bactérienne est de 500 UFC m^{-3} à 20 m en aval et est de 1×10^3 pour les champignons. Le bruit de fond de l'air pour les bactéries et les champignons est respectivement de $< 80 \text{ UFC m}^{-3}$ et de 300 UFC m^{-3} . La concentration des entérocoques, au bout des 25 jours, à 2 et 20 mètres en aval est identique (30 UFC m^{-3}) tandis que pour *Escherichia coli* elle est à 2 m de 50 UFC m^{-3} puis diminue à 15 UFC m^{-3} à 20 m. Le genre *Staphylococcus* est absent en amont et est retrouvé à 2 m en aval à une concentration de 50 UFC m^{-3} puis diminue de moitié au second point aval.

Fracchia *et al.* (2006) ont également observé la dispersion du bioaérosols sur deux stations d'épuration (Fracchia *et al.*, 2006a). Un point en amont (à 100 m) et un point en aval entre 50 et 100 m ont été réalisés pour chacun des sites. En comparant les concentrations obtenues pour chacun des points, il ressort que seulement pendant la période hivernale, la concentration des actinomycètes mésophiles en aval est deux à trois fois supérieure à celle de l'amont selon le site. Pour le second site, la concentration des bactéries cultivées à 37°C en aval est cinq fois supérieure à celle de l'amont. Contrairement à Brandi *et al.* qui trouvaient une concentration des coliformes ainsi que d'*Escherichia coli* en aval supérieure à celle de l'amont, Fracchia *et al.*, n'en détectent peu ($\approx 6 \text{ UFC m}^{-3}$) ou pas (aussi bien en amont qu'en aval). Les bactéries Gram négatif ne sont pas détectées en aval du site mais par contre elles le sont sur le site lors des étapes de dégrillage et de décantation.

La concentration microbienne des bioaérosols émis par les stations d'épuration et détectée en aval est faible ce qui suggère que les micro-organismes sont rapidement dilués avec la distance (au niveau biofiltre, la concentration des bactéries cultivées à 22°C est de $4 \times 10^3 \text{ UFC m}^{-3}$ et en aval ($> 50 \text{ m}$, la concentration a diminué de deux unités loga-

rithmiques).

Nous l'avons vu l'aérosolisation est présente sur les stations d'épurations d'eaux usées. Pour limiter l'émission vers l'atmosphère, en France, la tendance est à la couverture des installations. Un des intérêts, (employé pour limiter les odeurs) la couverture permet de diminuer les risques d'exposition aux bioaérosols émis pour les riverains. Tandis que pour les travailleurs, les micro-organismes aérosolisés seront plus concentrés sur les installations d'où la nécessité d'étudier ces bioaérosols et leurs effets sur la santé.

3.4 La digestion anaérobie

3.4.1 Principe de fonctionnement

La digestion anaérobie ou méthanisation consiste en la dégradation de la matière organique en anaérobiose. C'est un processus naturel, il a été retrouvé dans les sédiments, les marais, les rizières, ainsi que dans le tractus digestif des animaux tels que les termites, les ruminants. Le biogaz, produit terminal de la digestion, est composé majoritairement de méthane (2/3) et de dioxyde de carbone (1/3). La méthanisation est utilisée pour traiter des rejets organiques, comme les eaux usées, des boues de stations d'épurations, des déchets industriels, des ordures ménagères ... Il existe différents types de procédés qui sont adaptés pour les différents types de déchets.

Le processus de méthanisation se déroule en quatre étapes (hydrolyse, acidogenèse, acétogenèse et méthanogenèse), effectuées par différentes catégories de micro-organismes. Chaque composé dégradé au cours du processus sert de substrat à l'étape suivante (figure 3.5).

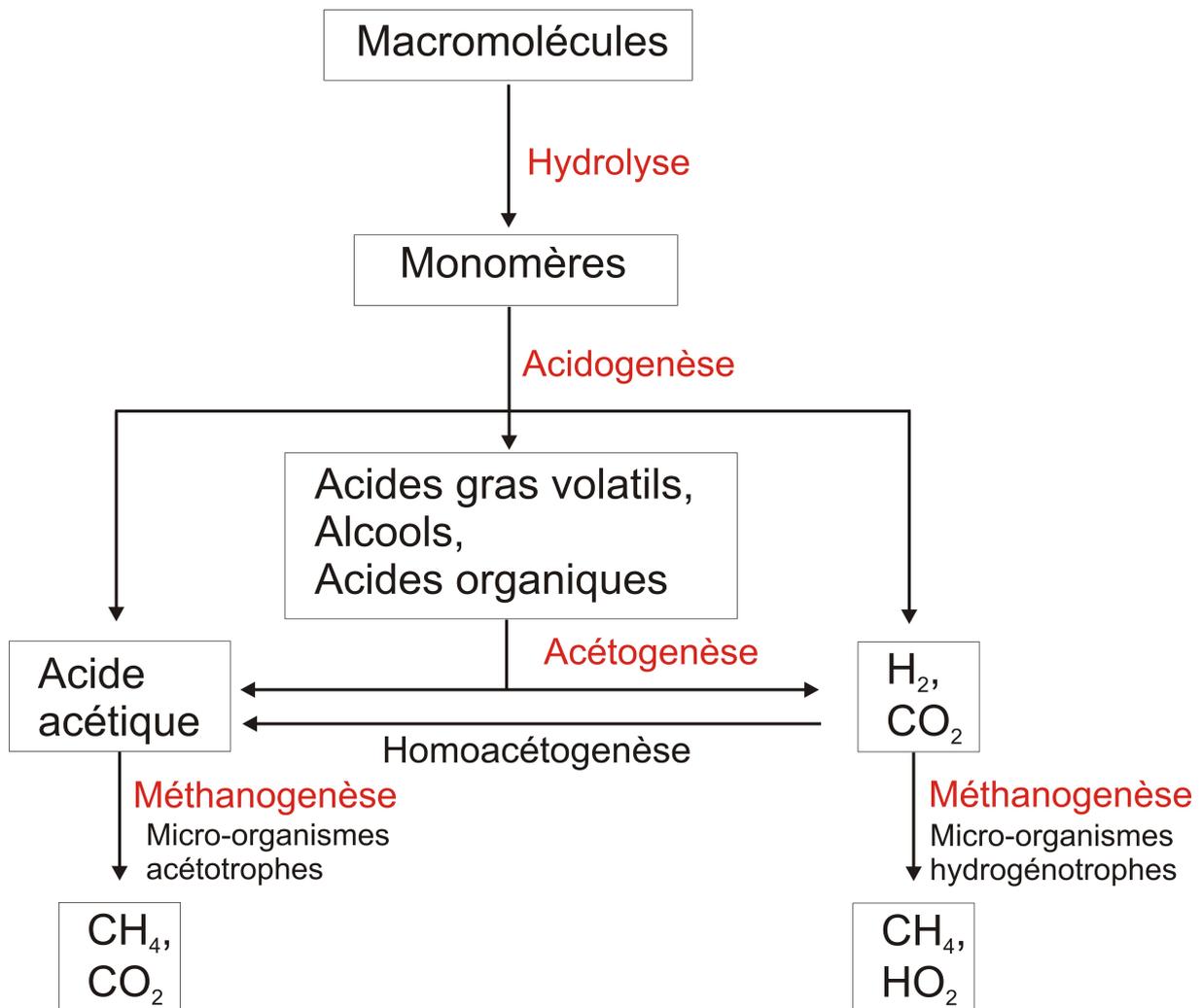


FIGURE 3.5 – Les différentes étapes de la digestion anaérobie

3.4.2 La composition des bioaérosols formés dans les méthaniseurs

Les principales études qui se sont intéressées à la recherche de micro-organismes présents dans le biogaz issu de digesteur anaérobie ont été réalisées par Moletta *et al.* et Vinneras *et al.* (Moletta, 2005; Moletta *et al.*, 2007; Vinneras *et al.*, 2006).

Vinneras *et al.* ont analysé la diversité microbienne par une approche culturale. La concentration bactérienne est comprise entre 1×10^{-5} et 1×10^{-3} UFC m^{-3} tandis que la concentration fongique est comprise entre 1×10^{-4} et 1×10^{-2} UFC m^{-3} . Deux genres fongiques ont été identifiés, il s'agit de *Mucor* et *Fusarium*. Les genres bactériens identifiés sont :

- affiliés au phylum *Actinobacteria* : *Micrococcus*, *Corynebacterium* et *Leucobacter*
- affiliés au phylum *Firmicutes* : *Clostridium*, *Bacillus* et *Streptococcus*
- affiliés au phylum β -*Proteobacteria* : *Burkholderia* et *Alcaligenes*

- affiliés au phylum γ -*Proteobacteria* : *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* et *Escherichia*

La seconde étude portant sur la diversité microbienne du biogaz a été effectuée avec l'utilisation d'outils moléculaires. 180 phylotypes ont été identifiés dans le biogaz émis de plusieurs digesteurs (Moletta et al., 2007).

La concentration au sein d'un digesteur anaérobie est estimée à 1×10^{18} procaryotes.m⁻³. Tandis que la concentration dénombrée par microscopie au sein du biogaz est de l'ordre de 6×10^5 et 2×10^7 procaryotes m⁻³ (Moletta et al., 2007).

Le tableau 3.4 présente les différents phyla identifiés dans le biogaz issu de digesteurs par rapport aux phyla identifiés au sein du procédé de digestion anaérobie. La valeur obtenue pour les digesteurs anaérobies est une moyenne de 14 digesteurs représentant plus de 800 phylotypes (Moletta et al., 2007).

TABLEAU 3.4 – Diversité bactérienne dans le biogaz et dans les digesteurs anaérobies (fréquence des phylotypes) (Moletta et al., 2007)

Phyla bactériens	Digesteur anaérobie (en %)	Biogaz (en %)
<i>Firmicutes</i>	39	30
<i>Actinobacteria</i>	4	17
<i>Bacteroidetes</i>	14	12
α - <i>Proteobacteria</i>	2	12
β - <i>Proteobacteria</i>	2	7
δ - <i>Proteobacteria</i>	11	2
γ - <i>Proteobacteria</i>	1	7
ϵ - <i>Proteobacteria</i>		1
<i>Synergistes</i>	7	1
<i>Chlamydiae-Planctomyces</i>	2	1
<i>Chloroflexi</i>	9	
<i>Spirochaeta</i>	4	
<i>Fibrobacteres</i>	2	
<i>Nitrospira</i>	1	
<i>Thermotogae</i>	1	
WS5	1	
<i>Acidobacteria</i>		1
<i>Cyanobacteria</i>		1
<i>Deinococcus-Thermus</i>		1
<i>Fusobacteria</i>		1
<i>Gemmentimonadetes</i>		1
TM7		1
WS1		1
WS6		1

D'après le tableau 3.4, dix-huit phyla bactériens ont été identifiés au sein du bioaérosol contre quinze phyla pour le digesteur. Les phyla *Firmicutes* et *Bacteroidetes* dominent au sein des deux environnements. Au niveau du bioaérosol, deux autres phyla, celui des *Actinobacteria* et les α -*Proteobacteria*, dominent tandis qu'au sein du digesteur, le phylum δ -*Proteobacteria* est également bien représenté.

Certains phyla bactériens (α -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria* et γ -*Proteobacteria*) sont plus représentés dans le biogaz que dans le digesteur, ce qui suggère une aérosolisation préférentielle contrairement à certains phyla (*Synergistes* et δ -*Proteobacteria*) qui sont plus faiblement représentés.

La diversité bactérienne présente dans les biogaz au niveau des phyla est plus proche de l'air extérieur que de celle des digesteurs anaérobies. En effet seulement 14% des phylotypes identifiés dans le biogaz ont été retrouvés dans des digesteurs anaérobies.

D'après l'étude, trois groupes de micro-organismes peuvent être différenciés, en fonction de leur capacité à s'aérosoliser. Ces trois groupes observés sont :

- le premier dit “micro-organisme préférentiellement aérosolisé” constitué principalement des *Proteobacteria* (α , β , γ).
- le second dit “micro-organisme non-préférentiellement aérosolisé” composé des archées ainsi que des *Synergistes*.
- et le dernier dit passif qui serait dû au fait que les micro-organismes sont aérosolisés de part les paramètres physiques employés (agitation, débit du procédé ...).

3.5 L'épandage

3.5.1 Généralités

L'épandage du compost, du lisier, du fumier mais également des boues de stations d'épuration peuvent s'effectuer sur des terres agricoles, permettant un apport en nutriment pour le sol et les cultures. En 2004, 60% des boues de stations d'épuration produites en France ont été épandues sur les terres agricoles (source Ministère de l'écologie <http://stats.environnement.developpement-durable.gouv.fr>).

Aux Etats-Unis en 2002, 6×10^6 millions de tonnes de boues (en poids sec) ont été produites dont plus de 50% ont été épandues (Brooks et al., 2005b).

Le fait d'épandre dans les champs génère des aérosols (figure 3.6) qui vont ensuite se disperser. Afin de limiter la génération d'aérosols lors de l'épandage, l'emploi de buses à basses pression ainsi que des “enfouisseurs” (injecte le lisier dans le sol) sont employés.



FIGURE 3.6 – Epannage sur les terres agricoles et formation d'un bioaérosol

3.5.2 Dispersion du bioaérosol émis lors de l'épandage de boues de stations d'épuration

Quelques études ont été menées sur l'épandage des boues urbaines (Brooks et al., 2007, 2005b; Tanner et al., 2008, 2005). Au sein des boues, des micro-organismes pathogènes comme *Salmonella*, des virus (*nonovirus*, *hepatitis A...*) peuvent s'aérosoliser durant l'épandage (Brooks et al., 2005b).

Des essais d'épandages d'une culture de *Escherichia coli* ainsi que d'un virus ont été réalisés. A 20 m de la source d'émission, la concentration n'est plus détectable. Ceci a permis aux auteurs de développer un modèle de dispersion des virus. Concernant le risque d'infection dû à l'aérosolisation des virus, il est minime pour des distances supérieures à 30 m (Brooks et al., 2005a).

D'autres études (Brooks et al., 2005b; Tanner et al., 2008) ont permis de dénombrer les coliformes totaux dont *Escherichia coli*, les bactéries hétérotrophes, les coliphages émis lors de l'épandage de boues de stations d'épurations. Le bruit de fond de l'air du site d'étude a été estimé à 1×10^3 UFC m^{-3} pour les bactéries hétérotrophes. Les différentes boues de stations ont été épandues, il en ressort que la concentration des bactéries hétérotrophes est comprise entre 1×10^4 et 1×10^5 UFC m^{-3} . Leurs concentrations mesurées dès 20 m étaient similaires à celle du bruit de fond de l'air. Les coliformes totaux ainsi que *Clostridium perfringens* sont détectés jusqu'à 15 m en aval de la source d'émission et *Escherichia coli* est détecté jusqu'à 5 m en aval. Les virus ne sont pas détectés (Brooks et al., 2005b). Tanner *et al.* (2005) ont montré que les andains de boues d'épuration étaient une source d'émission négligeable. Brooks *et al.* (2005) proposent la limite minimale de 30,5 m entre la population et la zone d'épandage des boues de stations d'épuration. Au delà de cette limite, le risque infectieux est négligeable.

Les boues étant pâteuses serait une hypothèse qui expliquerait le fait que les bioaérosols émis lors de l'épandage se dispersent peu.

Certaines de ces études de dispersion des bioaérosols ont été réalisées dans des régions désertiques, induisant un faible taux d'humidité de l'ordre de 20%. Le taux d'humidité joue un rôle sur la viabilité, il a été montré que pour certaines bactéries Gram négatif, une perte rapide de cultivabilité après l'aérosolisation à un taux d'humidité compris entre 20 et 25% et à une température de 20°C (Heidelberg et al., 1997). Donc le fait de ne pas détecter les micro-organismes ne signifie pas pour autant qu'ils soient absents.

3.5.3 Caractérisation du bioaérosol émis lors de l'épandage de boues de station d'épuration

Brooks *et al.* ont étudié la diversité microbienne des aérosols émis lors de l'épandage des boues. Les aérosols sont collectés à une distance de 5 m en aval de la source d'émission (Brooks et al., 2007). Lors de cette étude, cinq inventaires bactériens ont été réalisés (le sol, la boue, l'air ambiant, lors de l'épandage des boues et lors du passage de l'épandeur sans relargage des boues) (tableau 3.5). Au sein de la boue, la diversité bactérienne est répartie en quatre phyla dont le majoritaire est le phylum γ -*Proteobacteria*. Les inventaires effectués lors de l'épandage des boues et lors du non épandage sont similaires. Ces deux inventaires diffèrent de celui du bruit de fond de l'air. En comparant les différents inventaires entre eux, les auteurs concluent qu'aucune séquence provenant de l'épandage des boues ne peuvent être attribuée aux boues, mais que la plupart des séquences ont une origine terrigène (Brooks et al., 2007).

Il est difficile de tirer une conclusion sur l'origine des séquences car les différents inventaires constitués sont de faibles tailles.

TABLEAU 3.5: Composition bactérienne détectée dans les différents environnements (Brooks et al., 2007)

Origine	Sol	Boues ¹	Bruit de fond de l'air du site	épandage	Aérosolisation pas épandage ²	26
Nombres de clones	37	22	16	27		
Phyla bactériens détectés						
<i>Actinobacteria</i>	15		1	7		7
	<i>Nocardioïdes</i>		<i>Propionibacterium</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter</i>	2
	<i>Arthrobacter</i>			<i>Koccuria</i>	<i>Blasrococcus</i>	1
	<i>Cellulomonas</i>			nd ³	<i>Geodermatophilus</i>	1
	<i>Georgenia</i>				<i>Jiangellas</i>	1
	<i>Pseudonocardia</i>				<i>Koccuria</i>	1
	<i>Saccharothrix</i>				<i>Nocardioïdes</i>	1
	<i>Streptomyces</i>					
	<i>Virgosporangium</i>					
	nd					
	2					
<i>Bacteroidetes</i>	11					3
	<i>Flavobacterium</i>			2		3
	<i>Adhaeribacter</i>			2	nd	3
	<i>Pontibacter</i>					
	<i>Hymenobacter</i>					
	<i>Marinicola</i>					
	nd					
	1					
<i>Chloroflexi</i>						
		7				
		nd				
		7				

Origine	Sol	Boues ¹	Bruit de fond de l'air	16	27	26
Nombres de clones	37	22	16	27	pas épandage ²	
<i>Firmicutes</i>	1	1	1	3	1	1
	<i>Bacillus</i>		<i>Lactococcus</i>	<i>Planomicrobium</i>	<i>Ammoniphilus</i>	1
				<i>Bacillus</i>	1	1
α - <i>Proteobacteria</i>	6	2	6	5	13	
	<i>Methylobacterium</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas</i>	6
	<i>Sphingomonas</i>	nd	<i>Agrobacterium</i>	<i>Skermanella</i>	<i>Methylobacterium</i>	2
			<i>Sphingobium</i>	1	<i>Skermanella</i>	2
					<i>Chelatococcus</i>	1
					<i>Corbulabacter</i>	1
					nd	1
β - <i>Proteobacteria</i>		2	2	7	1	1
		<i>Thaurea</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>Massilia</i>	<i>Massilia</i>	1
			<i>Delftia</i>	nd	5	
γ - <i>Proteobacteria</i>	2	11	6	1	1	
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Providencia</i>	1	
			<i>Stenotrophomonas</i>	2		
		<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>	1		
nd	2			2		1

¹ boue mésophile digérée en condition anaérobie pendant 15-20jours

² passage du tracteur pas d'épandage de boues

³ non déterminé

3.6 Le compostage

3.6.1 Définition

Il existe plusieurs définitions du compostage, selon Francou (Francou, 2003), il s'agit : “d'un processus contrôlé de dégradation des constituants organiques d'origine végétale et animale, par une succession de communautés microbiennes évoluant en condition aérobie, entraînant une montée en température et conduisant à l'élaboration d'une matière organique humifiée et stabilisée. Le produit obtenu est appelé compost”.

Quant au compost, sa définition est la suivante : “matière humique stable, assainie, riche en matière organique et non nauséabonde, qui résulte du compostage des biodéchets” (Hours, 2003). Cette définition correspond à un procédé industriel mais le compostage “naturel” existe dont sa définition plus générale serait : “dégradation biologique de la matière organique en condition aérobie”.

Le processus correspond à une oxydation de la matière organique avec la formation d'eau, de dioxyde de carbone et de dégagement important de chaleur. Dans la nature, il correspond au processus d'humification présent dans les sols. La chaleur métabolique générée par l'activité respiratoire microbienne est conservée dans la matrice, conduisant à une élévation de la température.

Les objectifs du compostage industriel sont :

- de stabiliser les déchets afin de réduire les pollutions ou nuisances qui peuvent être associées à son évolution biologique, dues à la présence de matières organiques biodégradables.
- de permettre de réduire le gisement par diminution de la masse de déchet.
- de valoriser le produit fini comme un amendement ou engrais pour les sols agricoles.

3.6.2 Les plates-formes de compostage

Les principaux déchets compostables sont les déchets verts, 51% (tontes, haies, feuilles mortes) des municipalités ou des entreprises, les ordures ménagères (grises (31%) ou la fraction fermentescible (4%)), les boues de stations d'épuration des eaux usées urbaines ou industrielles (7%). Les autres types de déchets représentent 7%, il s'agit principalement de déchets agricoles et des résidus des industries agroalimentaires (ADEME, 2002).

Le volume des déchets organiques produit en France en 2008 est estimé à 47×10^6 t de matière brute. La part compostable représente 11% et est en augmentation chaque année de même que le nombre de plates-formes de compostage (figure 3.7). En 2008, 520 plates-formes de compostage ont été recensées. La quantité de compost produit est proche de 2 millions de tonnes de matière brute depuis 2004 (ADEME, 2008).

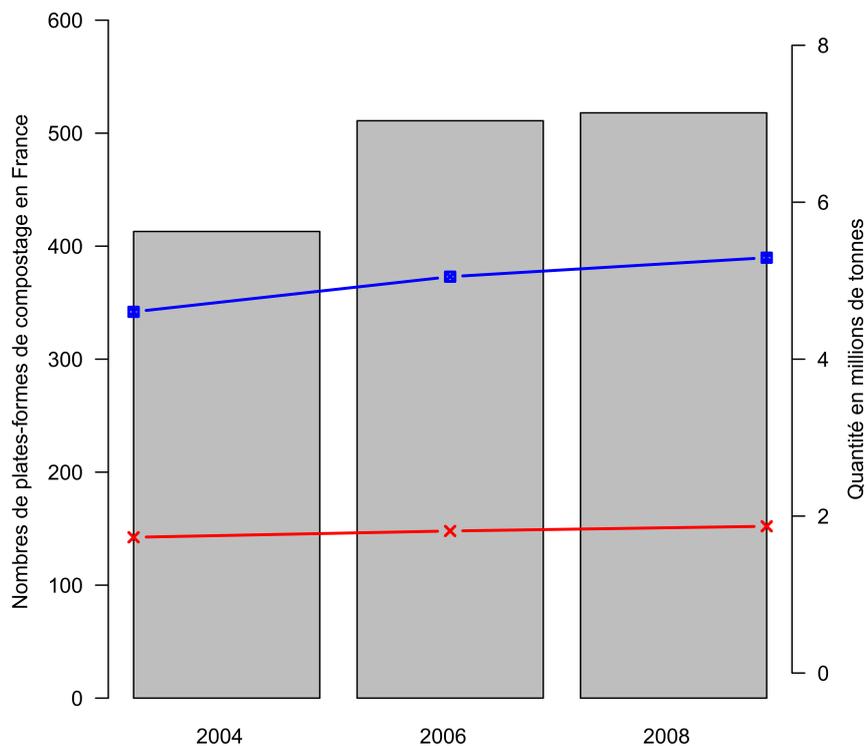


FIGURE 3.7 – Evolution du nombre de plates-formes de compostage en France depuis 2004, de la quantité de déchets entrants (■) et du compost produit (×) exprimé en tonnes de matière brute

3.6.2.1 Les différentes étapes du procédé

Le procédé de compostage est constitué de plusieurs phases (figure 3.8). Le compostage peut être divisé en quatre phases en fonction de la température qui sont la phase mésophile, la phase thermophile, la phase de refroidissement et enfin la phase de maturation (Fogarty and Tuovinen, 1991).

L'élévation de la température entraîne une diminution des micro-organismes mésophiles et à l'inverse une augmentation des micro-organismes thermophiles. La majeure partie de la formation de la biomasse microbienne ainsi que des réactions de dégradation de la matière organique ont lieu lors de la phase thermophile, lorsque la température est comprise entre 45–65°C. Quand les matières facilement dégradables sont limitantes, l'activité microbienne diminue, refroidissant le compost. Ce refroidissement permet une recolonisation par des micro-organismes mésophiles (Fogarty and Tuovinen, 1991; Sharma et al., 1997). Pendant la maturation, les composés les plus complexes sont dégradés.

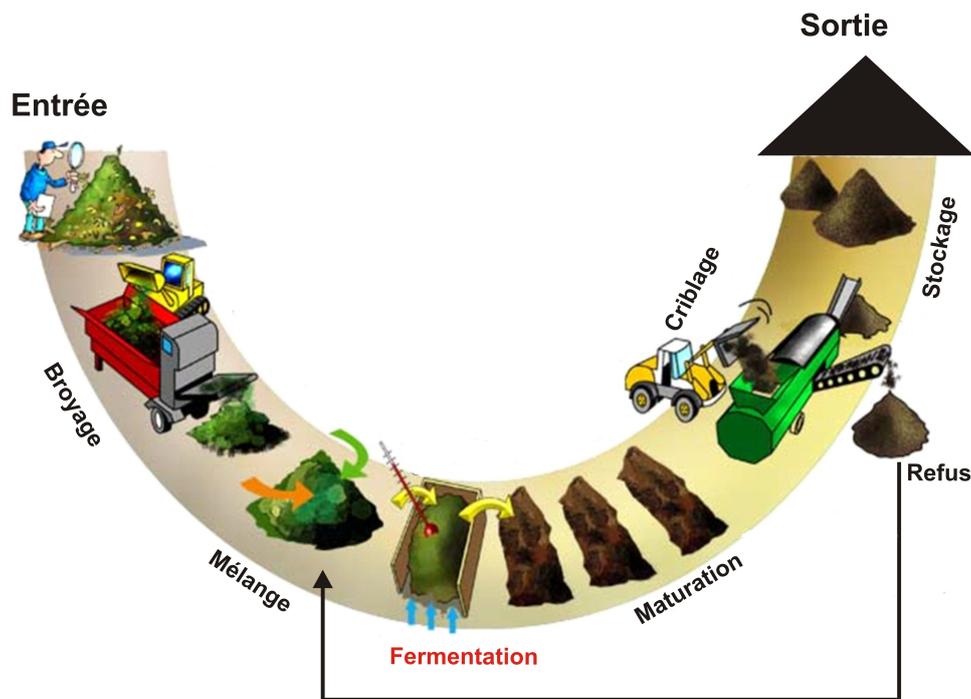


FIGURE 3.8 – Les différentes étapes du procédé de compostage

3.6.2.1.1 Réception des déchets

Il s'agit de la première phase. Les déchets entrent sur le site. Un premier contrôle permet de vérifier la qualité des entrants. Ils sont entreposés en tas en attente soit d'un broyage (déchets verts) soit d'un criblage (ordures ménagères). La nature des déchets entrants varie selon la période de l'année et la provenance. Les déchets verts sont broyés afin d'obtenir une granulométrie plus fine et également une réduction du volume de 2/3. Lors du compostage des boues de stations, des déchets verts sont incorporés (structurant) de façon à obtenir une structure solide.

Concernant les ordures ménagères, les déchets passent dans un bioréacteur stabilisateur avant la mise en andains. Ce bioréacteur fait une cinquantaine de mètres de long pour un diamètre de quatre mètres, tournant en permanence ce qui permet aux déchets d'avancer. Le temps de séjour des déchets dans le bioréacteur stabilisateur est de trois à quatre jours. Les déchets sont brassés, humidifiés pour permettre l'accélération de l'extraction de la fraction fermentescible. Les déchets inertes (plastiques, verres, métaux) sont éliminés le long du processus par un tri magnétique, suivi de deux criblages. A l'intérieur du bioréacteur, une fermentation aérobie est assurée par les micro-organismes présents dans les déchets. Au bout des trois jours, la fraction fermentescible obtenue est mise en andain pour subir l'étape suivante qui est la fermentation.

3.6.2.1.2 Fermentation

La phase de fermentation¹ est l'étape prépondérante du procédé de compostage car elle correspond à l'étape principale de décomposition de la matière organique. Après mélange, les déchets sont disposés en andains. Ainsi débute la phase de fermentation.

Avant la phase thermophile, il y a une première étape de dégradation des composés facilement dégradables (sucres, amidon...) par les micro-organismes mésophiles, il s'agit de la phase mésophile. Cette phase est principalement caractérisée par une augmentation de la température, ainsi qu'une variation du pH (acidification $\text{pH} \approx 4$) (Fogarty and Tuovinen, 1991; Schloss et al., 2003).

La température au sein de l'andain atteint généralement les 70°C. Cette augmentation de la température est due à l'activité des micro-organismes. La température optimale de la phase de fermentation semble se situer aux alentours de 60°C (De Bertoldi, 1993; McKinley et al., 1985; Strom, 1985). Durant cette phase, les micro-organismes thermophiles prennent le relais des micro-organismes mésophiles et terminent de dégrader les composés facilement dégradables pour ensuite s'attaquer à des composés plus difficilement dégradables (celluloses, lignine...).

Pour rester dans les conditions de bon déroulement du procédé, il est nécessaire de fournir de l'oxygène et un taux d'humidité voisin de 50%. L'apport d'humidité s'effectue par arrosage des andains (certaines plates-formes utilisent les eaux de ruissellement) tandis que l'apport d'oxygène peut se faire principalement de trois façons :

- la première consiste à retourner les andains périodiquement de manière mécanique. Le retournement est principalement effectué avec soit un chargeur soit un enjambeur mais il existe d'autres mécanismes (fraises, tourneur à vrille, convoyeur)
- la seconde, dite aération forcée, est de placer des tuyaux d'air sous les andains pour insuffler ou aspirer de l'air.
- la troisième, dite aération passive, consiste à insérer ou pas des tuyaux sous les andains favorisant le passage de l'air.

Il existe également des plates-formes de compostage fermées. C'est à dire que le compostage est réalisé dans des réacteurs, des silos ou des tunnels. L'aération est obligatoirement forcée. L'avantage de ce procédé, plus rapide, grâce aux contrôles des paramètres, mais en contrepartie il est plus coûteux.

L'avantage de retourner les andains par rapport à l'aération forcée est qu'il assure un brassage des composés. Ainsi chacune des particules peut se retrouver sur les parties extérieures puis au centre de l'andain.

Cependant selon Mustin (Mustin, 1987), entre deux retournements, le volume en anaérobiose est estimé à 50%, ce qui constitue un facteur limitant de ce mode d'aération. Cet

1. Il s'agit d'un terme employé en procédé et non en microbiologie. En microbiologie la fermentation est le catabolisme anaérobie au cours duquel un composé organique sert à la fois de donneur et d'accepteur d'électrons.

auteur a montré qu'un gradient en oxygène en fonction de la profondeur dans l'andain se mettait en place cinq heures après un retournement. La concentration en oxygène est de 20 – 21% jusqu'à 20 cm de profondeur. A 40 cm de profondeur, la concentration a diminué de moitié (10%). Arrivé à 80 cm de profondeur, la zone anoxique est atteinte. D'autres études (Beck-Friis et al., 2000; He et al., 2000) confirment la présence de zones anaérobies durant la fermentation.

La phase de fermentation, en plus de la dégradation de la matière organique, permet également une "hygiénisation" du compost. Lors d'un procédé de compostage bien suivi, il est important que l'andain reste un certain nombre de jours définis à une certaine température. Pour garder cette température, un retournement peut être réalisé afin de relancer l'activité microbienne et ainsi maintenir plus longtemps le compost à des températures élevées. Un minimum de 55-60°C pendant deux à trois jours consécutifs est recommandé pour obtenir un compost "hygiénisé" (Sharma et al., 1997). En France, la réglementation relative aux plates-formes de compostage produisant plus de 10 t par jour impose selon le type d'aération (ICPE arrêté du 22 avril 2008) :

- aération effectuée par retournement : 3 semaines de fermentation minimum avec 3 retournements espacés d'au moins trois jours et une température de 55°C pendant 72 heures
- aération forcée : 2 semaines de fermentation minimum avec 1 retournement et une température de 55°C pendant 72 heures

3.6.2.1.3 Phase de refroidissement

Cet étape correspond à une transition entre la phase de fermentation et la phase de maturation. Elle est caractérisée par une baisse de la température, induisant une modification de la diversité microbienne présente dans l'andain. Cette diminution de la température est due au ralentissement de l'activité microbienne.

3.6.2.1.4 Maturation

Après l'étape de refroidissement, la phase de maturation qui correspond à une stabilisation de la matière organique (humification) du compost on parle alors de maturité. La diversité microbienne s'intensifie ce qui permet de garder le compost "hygiénisé" en empêchant l'installation de micro-organismes pathogènes. En effet, comme il y a peu de substrat disponible, ceci entraîne une compétition entre les micro-organismes. Les substrats disponibles sont principalement la cellulose et la lignine. Les micro-organismes les plus efficaces à dégrader ces composés sont les champignons, plus principalement ceux affiliés au *Basidiomycota* (Tuomela et al., 2000).

3.6.2.1.5 Criblage

L'étape de criblage intervient après la phase de maturation et permet d'obtenir du compost "fini". Plusieurs types de diamètres sont utilisés selon la qualité du compost et

l'utilisation voulue (espaces verts, grandes cultures, particuliers. . .). Le refus de criblage est recyclé et repart en tête du procédé.

Une étape de criblage peut également être effectuée à la fin de la phase de fermentation, ainsi le compost criblé va en maturation et le refus repart en tête du procédé.

3.6.2.1.6 Valorisation

Au stade de maturation, le compost peut être valorisé. Il existe différentes voies qui sont représentées par la figure 3.9. La principale voie de la valorisation du compost est l'utilisation pour les grandes cultures. Le compost sert comme engrais ou amendement organique pour la culture du blé.

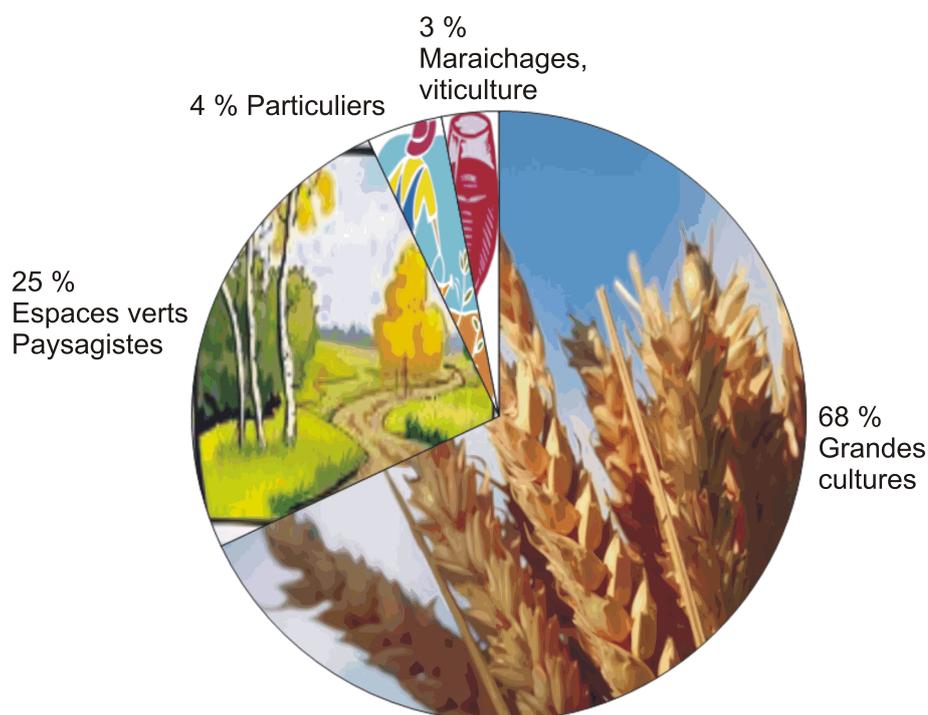


FIGURE 3.9 – Les différentes voies de valorisation du compost en France, en 2008 (source ADEME)

Le compostage n'est pas uniquement réservé aux industriels, les particuliers peuvent également réaliser leur propre compost. Ceci permet de réduire le volume de déchets d'ordures ménagères (360 kg par an et par habitant) et produire de l'amendement pour le jardin. Le principe est le même que pour les sites industriels mais à une échelle réduite.

L'aération s'effectue lors du brassage du compost qui se fait à différents intervalles, plus régulièrement en phase de fermentation puis une à deux fois par mois. Concernant les micro-organismes émis vers l'atmosphère, à l'heure actuelle aucune étude n'a été réalisée sur le compostage individuel (rapport ecoval 2009).

3.6.2.2 Diversité microbienne au sein du compost

La diversité microbienne du compost est dynamique et évolue en fonction des différentes phases du procédé (figure 3.10), en fonction des paramètres physico-chimiques (température, oxygène, humidité, pH), des composés présents et de la matière organique (rapport carbone sur azote).

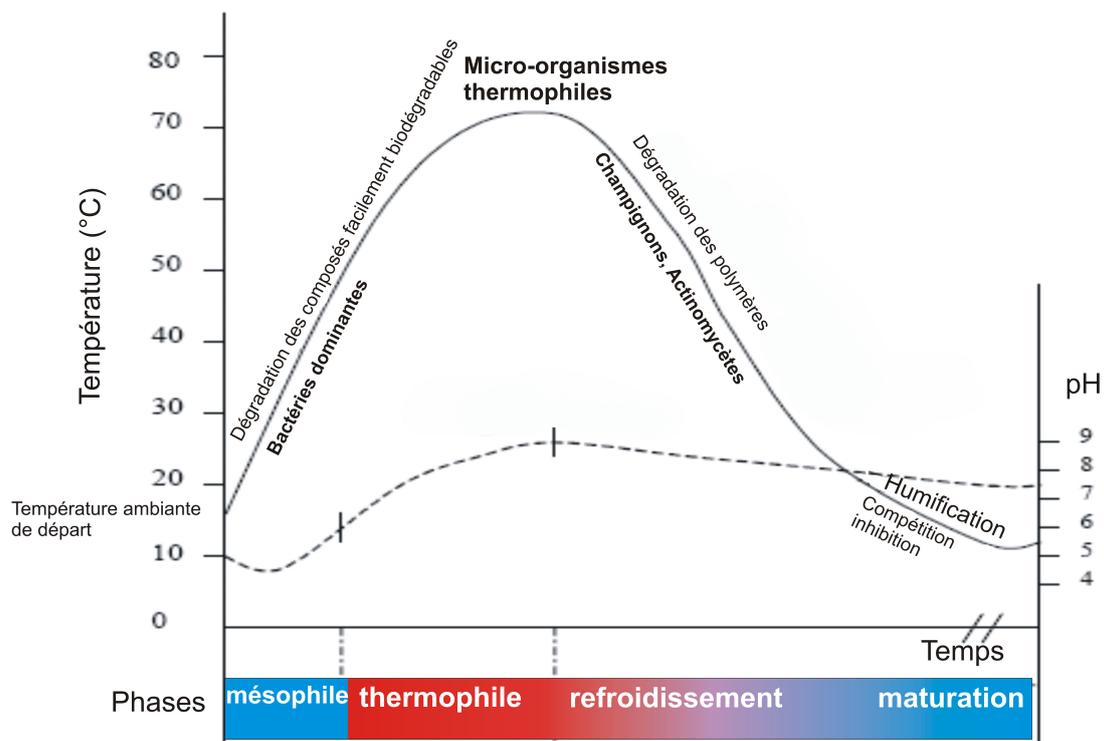


FIGURE 3.10 – Différentes phases du compostage en fonction de la température, (Mustin, 1987). La température est mentionnée par le trait plein tandis que le pH est indiqué en pointillé

La diversité microbienne au sein de l'environnement de compost est importante (24 phyla identifiés) et est représentée sur la figure 3.11. 6 phyla dominent : *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* et les *Proteobacteria* (γ , β et α).

Cette représentation est une vision globale des micro-organismes présents dans le compost sur l'ensemble du procédé. Comme nous l'avons vu précédemment, il y a différentes phases de compostage impliquant une dynamique des populations microbiennes au cours du procédé.

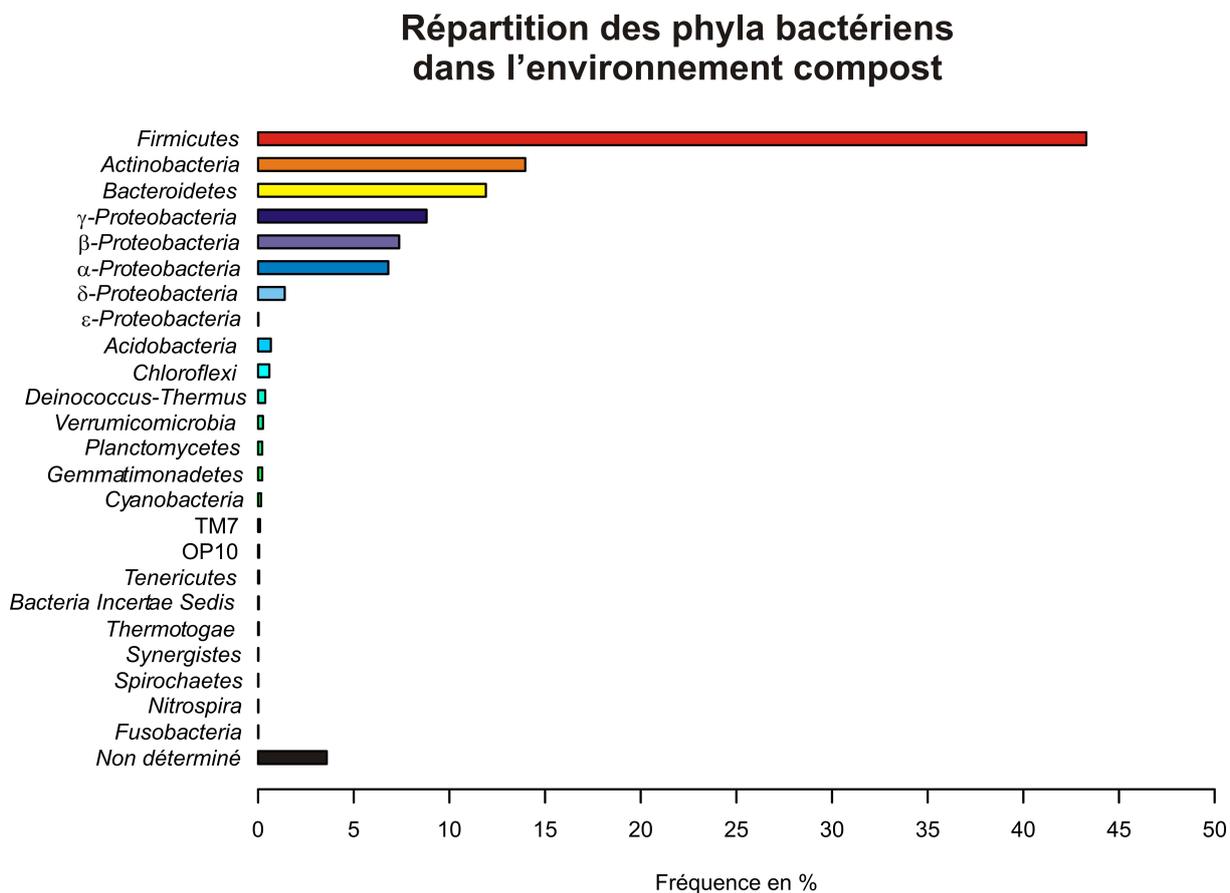


FIGURE 3.11 – Répartition des phyla bactériens dans l'environnement compost (séquences obtenues à partir de rdp10 (<http://rdp.cme.msu.edu/>))

Dès les premières étapes, la nature des déchets compostés influe sur la diversité microbienne : déchets verts (différents selon la saison), les ordures ménagères, les boues de station d'épuration, les déchets industriels. . . (tableau 3.6) (Deportes et al., 1995; Schlosser, 2007).

TABLEAU 3.6 – Contenu microbien dans les déchets (Deportes et al., 1995; Schlosser, 2007)

Types déchets		Micro-organismes présents
Déchets verts	Bactéries Gam négatif	<i>Archromobacter, Enterobacter, Pseudomonas, Klebsiella</i>
	Bactéries Gam positif	<i>Micrococcus, Streptococcus, Bacillus</i>
	Actinomycètes	<i>Streptomoyces, Rhodococcus, Agromyces</i>
	Champignons	<i>Saccharopolyspora, Thermoactinomyces, Thermomonospora, Saccharomonospora Alternaria, Cladrosporium, Fusarium Aspergillus, Penicillium, Eurotium, Mucor, Absidia</i>
Ordures ménagères	Bactéries Gam négatif	<i>Enterobacter, Escherichia, Proteus, Pseudomonas, Klebsiella, Serratia, Citrobacter</i>
	Bactéries Gam positif	<i>Staphylococcus, Streptococcus</i>
	Champignons	<i>Aspergillus, Penicillium</i>
Boues de stations d'épuration ¹	Virus	<i>Enterovirus, Poliovirus, Coxsachivirus, Echovirus, Mixovirus, Adenovirus, Astrovirus, Calicivirus, Coronavirus, Parvovirus, Reovirus, Rotavirus, Norwalk virus, virus Hépatite A et E, Acanthamoeba, Diantamoeba, Entamoeba, Giardia, Isospora, Naegleria, Balantidium, Sarcocystis, Toxoplasma, Blastocystis, Cryptosporidium</i>
	Protozoaires	<i>Ankylostoma, Ascaris, Echinococcus, Echonococcus, Enterobium, Hymenolepsis, Necator, Strongyloides, Taenia, Toxocara, Trichuris</i>
Helminthes	Bactéries	<i>Arizona, Aeromonas, Bacillus, Brucella, Campylobacter, Citobacter, Clostridium, Enterobactericea, Escherichia, Leptospira, Proteus, Providencia, Pseudomonas, Salmonella, Serratia, Shigella, Staphylococcus, Steptococcus, Vibrio, Yersinia</i>
	Champignons	<i>Aspergillus, Candida albicans, Candida guilliermondii, Candida krusei, Candida tropicalis, Cryptococcus, Epidermophyton, Geotrichum, Microsporium, Phialophora, Trichosporon, Tricophyton</i>

¹ micro-organismes pathogènes

Au sein des déchets, la communauté bactérienne mésophile est estimée entre 1×10^7 et 1×10^{10} UFC g^{-1} de substrat (Ryckeboer et al., 2003b; Tiquia, 2002). Les actinomycètes mésophiles sont présents entre 1×10^8 et 1×10^9 UFC g^{-1} de substrat (Tiquia, 2002). Le genre *Bacillus* prédomine dans les différents types de déchets (Ishii and Takii, 2003; Ryckeboer et al., 2003b; Schloss et al., 2003). Certains auteurs ont également observé la présence de bactéries lactiques (*Pediococcus*, *Lactococcus* et *Weissella*) dans des déchets alimentaires mélangés avec des déchets verts (Ishii and Takii, 2003; Peters et al., 2000; Schloss et al., 2003). Des genres associés à la famille des *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* et *Serratia*) ont été détectés dans les déchets alimentaires (Schloss et al., 2003; Silva et al., 2009).

La diversité microbienne présente dans le type de déchets semble avoir une influence sur la diversité des communautés en fin de compostage (Ishii and Takii, 2003; Tiquia, 2002).

Les archées, peu étudiées dans le compost, ont été détectées. Les principaux genres identifiés sont *Methanothermobacter*, *Methanosarcina*, *Methanoculleus*, *Methanobacterium* et Rice cluster I, III et IV (Thummes and Jackel, 2007a,b). Les virus sont peu étudiés dans les environnements compost, une hypothèse serait qu'ils soient en concentration trop faible pour pouvoir les détecter.

L'inventaire effectué par Ryckeboer *et al.* en 2003 au cours du procédé de compostage, a permis de recenser 155 espèces de procaryotes, 33 actinomycètes issus de 66 genres différents et de 408 espèces fongiques affiliés à 166 genres (Ryckeboer et al., 2003a).

De façon schématique, la succession des populations microbiennes est la suivante : développement des bactéries puis lors de la phase thermophile, une dominance des bactéries thermophiles (actinomycètes, *Bacillus*, *Thermus* ...) (figure 3.12). Quand la température redescend aux environs de $50^{\circ}C$, les champignons se développent, notamment *Aspergillus* et *Penicillium*. Lors de la phase de maturation, les actinomycètes, les champignons sont majoritairement présents car ils sont capables de dégrader des composés comme la cellulose et la lignine (Szekely et al., 2008; Tuomela et al., 2000).

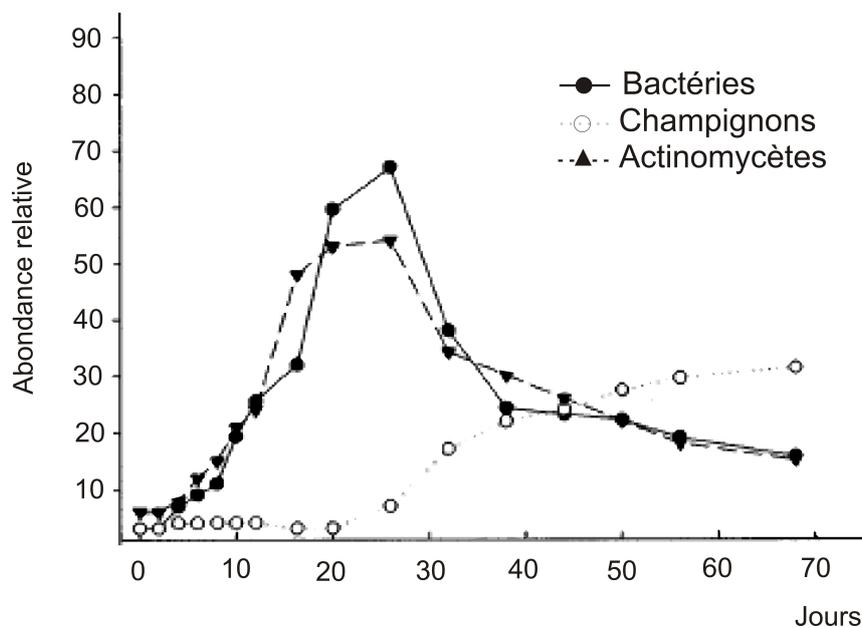


FIGURE 3.12 – Abondance relative des bactéries, champignons et actinomycètes au cours du procédé de compostage (Ryckeboer et al., 2003a)

Lors de la phase mésophile, la concentration des bactéries dans les déchets se situent entre 1×10^9 et 1×10^{13} UFC g^{-1} de substrat et celle des actinomycètes est comprise entre 1×10^8 et 1×10^{12} UFC g^{-1} de substrat (Ryckeboer et al., 2003). Lors de cette phase le genre *Bacillus* domine ainsi que les genres *Micrococcus*, *Planococcus* et *Staphylococcus* (Hassen et al., 2001; Ishii and Takii, 2003; Schloss et al., 2003). L'apparition des bactéries lactiques provoque à la chute de pH observée (figure 3.10) (Alfreider et al., 2002; Schloss et al., 2003). Ces bactéries sont les principales dégradatrices des composés tels que le sucre, l'amidon . . . La remontée de pH est due à la dégradation des composés formés par les bactéries lactiques et les levures (Choi and Park, 2002).

Les bactéries identifiées dans la phase thermophile sont majoritairement affiliés aux phyla *Firmicutes* et *Actinobacteria* (Blanc et al., 1999, 1997; Dees and Ghiorse, 2001; Herrmann and Shann, 1997; Ryckeboer et al., 2003b; Strom, 1985). La concentration bactérienne dans cette phase est comprise entre 1×10^8 et 1×10^{12} UFC g^{-1} de substrat tandis que la concentration des actinomycètes varie entre 1×10^7 et 1×10^9 UFC g^{-1} de substrat (Ryckeboer et al., 2003). Pour les champignons, le phylum *Ascomycota* est dominant et représenté par les genres *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium* et *Penicillium* (Anastasi et al., 2005; Cahyani et al., 2004; Peters et al., 2000; Riachi, 1998; Ryckeboer et al., 2003b; Strom, 1985). Lors de cette phase thermophile, des bactéries mésophiles ont été détectées ce qui indique qu'elles sont thermotolérantes. Il s'agit de bactéries affiliées au phylum γ -*Proteobacteria* : *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* et *Serratia* (Droffner et al., 1995; Peters et al., 2000). La présence de bactéries mésophiles peut être due à l'hétérogénéité de la température au sein de l'andain, de la thermotolérance de certains micro-organismes et aussi aux spores. Elles peuvent également provenir d'un dépôt aérien.

Les bactéries thermophiles réalisent la plus grande partie du processus de dégradation de la matière organique durant cette phase (Beffa et al., 1998; Herrmann and Shann, 1997; Klamer and Baath, 1998; Strom, 1985). La concentration du genre *Bacillus* dans différents composts varie entre 1×10^7 et 1×10^{11} UFC g^{-1} de substrat (Beffa et al., 1998; Herrmann and Shann, 1997; Ishii et al., 2000; Peters et al., 2000; Ryckeboer et al., 2003b; Strom, 1985). L'espèce *Geobacillus stearothermophilus* a été également identifiée lorsque la température était comprise entre 65 et 69°C (Beffa et al., 1998; Strom, 1985).

Lors de la phase de refroidissement, la concentration bactérienne est de l'ordre de 1×10^8 – 1×10^{11} UFC g^{-1} de substrat (Ryckeboer et al., 2003b). La diminution de la température entraîne une augmentation de la microflore principalement les micro-organismes thermosensibles (Herrmann and Shann, 1997; Ryckeboer et al., 2003b; Steger et al., 2007). Les champignons (*Aspergillus*, *Mucor*, *Verticillium*...) apparaissent alors qu'ils étaient peu ou pas présents dans la phase thermophile (Ryckeboer et al., 2003a). Concernant les bactéries, les *Bacteroidetes* et les β -*Proteobacteria* ont été identifiés (Alfreider et al., 2002; Ishii and Takii, 2003; Ryckeboer et al., 2003a). L'abondance de micro-organismes ayant des activités amylolytiques, cellulolytiques et lignolytiques a été observée au cours de cette phase de refroidissement (De Bertoldi, 1993; Ryckeboer et al., 2003b).

Au cours de la phase de maturation, la concentration bactérienne est estimée entre 1×10^3 et 1×10^8 UFC g^{-1} de substrat et celle des champignons entre 1×10^4 et 1×10^5 UFC g^{-1} de substrat (Beffa et al., 1998).

La forte présence du phylum *Bacteroidetes* indiquée sur la figure 3.11 est liée à leur dominance lors de la phase de maturation (Danon et al., 2008; Takaku et al., 2006; Vaz-Moreira et al., 2007). L'étude de Szekely *et al.* réalisée également sur la phase de maturation, montre que le phylum dominant est γ -*Proteobacteria* (Szekely et al., 2008). Cette différence observée est due à la nature du compost étudié. Takaku *et al.* ont analysé un compost élaboré de déchets alimentaires et de riz. Tandis que Szekely *et al.* ont analysé un compost ayant une origine "agricole" (mélange de paille et de fumiers).

Certaines études se sont attachées à décrire la succession des différents phyla bactériens au cours d'un procédé de compostage (composition des déchets entrants puis suivi temporel) (figure 3.13) (Amir et al., 2008; Ishii et al., 2000; Ishii and Takii, 2003; Klamer and Baath, 1998; Szekely et al., 2008; Takaku et al., 2006).

Klamer *et al.* ainsi que Amir *et al.*, en utilisant la méthode de détection des acides phospholipides (PLFA) montrent une forte augmentation des bactéries Gram positif lors de la phase thermophile puis une diminution rapide quand arrive la phase de refroidissement. Ils montrent également que les bactéries Gram négatif diminuent au cours du procédé et que les champignons apparaissent au cours de la phase de refroidissement – maturation.

Iskii *et al.*, par l'utilisation d'outils moléculaires (DGGE) ont observé la présence de bactéries lactiques ainsi que *Staphylococcus*, *Pediococcus* et *Bacillus* dans la phase mésophile, puis lors de la phase thermophile des genres *Bacillus* et *Corynebacterium*, affilié

au phylum *Actinobacteria*. Lors de la phase de maturation, la présence des phyla *Firmicutes* et *Bacteroidetes* est observée. Szekely *et al.*, ont seulement observé la diversité microbienne (par T-RFLP) lors de la phase de maturation et montrent qu'elle est dominée par les γ -*Proteobacteria*. Takaku *et al.*, ont analysé la dynamique des populations microbiennes tout au long du procédé (figure 3.13). Il en ressort que du temps 0 jusqu'au 9^e jour, période correspondant à la phase de fermentation, le phylum *Firmicutes* domine, puis au 14^e jour (phase de refroidissement) deux phyla dominent (*Firmicutes* et *Bacteroidetes*). A partir du 18^e jour et jusqu'à la fin (phase de maturation), le phylum *Bacteroidetes* domine (représente jusqu'à 80% des séquences) tandis que le phylum *Firmicutes* disparaît.

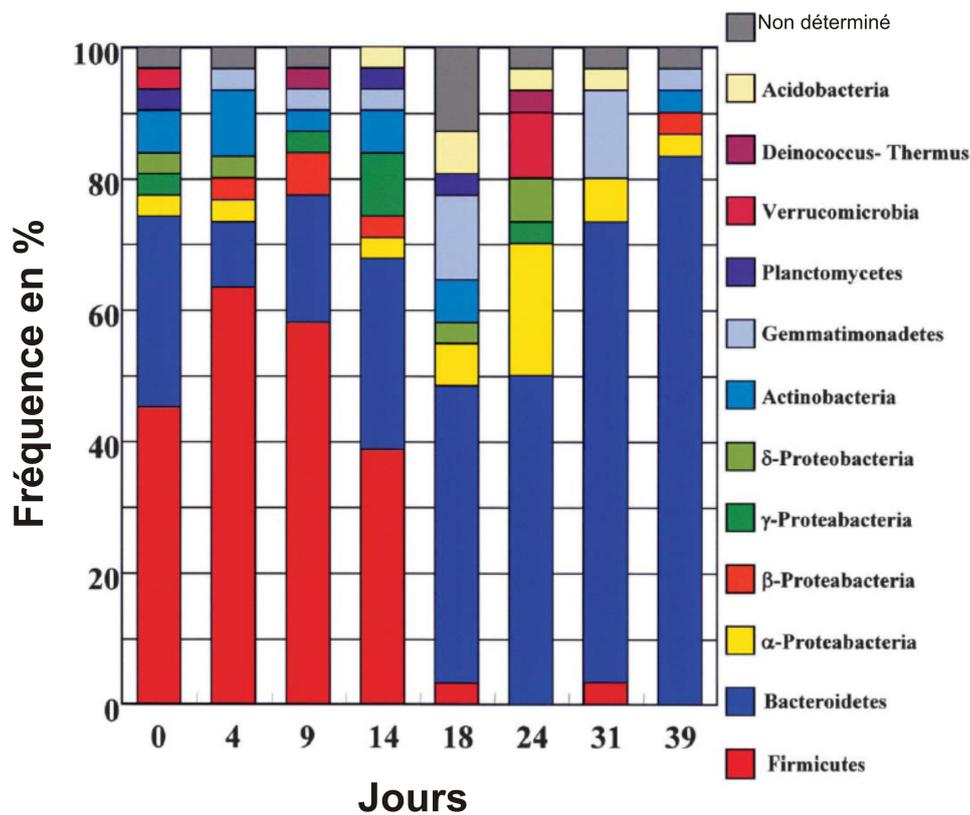


FIGURE 3.13 – Dynamique des différents phyla bactériens au cours du compostage (Takaku *et al.*, 2006)

La succession fongique a été observée par Cahyani *et al.* et ils ont montré que le phylum *Ascomycota* était présent à chaque étape du procédé tandis que le phylum *Basidiomycota* apparaissait lors de la phase de maturation (Cahyani *et al.*, 2004).

3.6.2.3 Caractérisation des bioaérosols de compostage

3.6.2.3.1 Les différents types d'émissions des bioaérosols

Sur les plates-formes de compostage, il existe deux types d'émissions de bioaérosols qui sont :

- Les émissions hors manipulation des andains, il s'agit d'émission "passive" ou "naturelle"
- Les émissions liées à la manipulation des déchets (broyage, brassage, retournement, criblage)

Les émissions "passives" des andains sont négligeables par rapport aux émissions lors de la manipulation. Une étude s'est intéressée à ces deux types d'émissions, la concentration d'*Aspergillus fumigatus* mesurée lors d'une émission "passive" est comprise entre $1,9 \times 10^4$ et $2,8 \times 10^4$ UFC m^{-3} tandis que lors du retournement, la concentration à 10 m est de l'ordre de 1×10^7 UFC m^{-3} (Taha et al., 2006). Les auteurs concluent en disant que les émissions de bioaérosols lors des activités sont supérieures de plus de 2–3 unités logarithmiques par rapport aux émissions "passives".

3.6.2.3.2 Les principales activités génératrices des bioaérosols

Les principales activités générant des bioaérosols sur les plates-formes de compostage sont liées aux activités mécaniques effectuées tout au long du procédé de compostage (Deloraine et al., 2002) :

- dans la zone de réception des déchets
- dans la zone de fermentation
- dans la zone de retournement et d'affinage du compost
- dans la zone de broyage et de criblage

Les principaux paramètres mesurés sont les bactéries totales, les champignons totaux, les bactéries et les champignons thermophiles ainsi que des groupes microbiens comme les bactéries Gram négatif, les actinomycètes ou une espèce (*Aspergillus fumigatus*) (Albrecht et al., 2007; Clark et al., 1983; Grisoli et al., 2009; Hryhorczuk et al., 2001; Kampfer et al., 2002; Millner et al., 1980; Nikaeen et al., 2009; Sanchez-Monedero and Stentiford, 2003). La recherche et le dénombrement sont réalisés par l'utilisation de méthodes culturales.

La figure 3.14 représente les concentrations des différentes activités réalisées sur une plate-forme de compostage ouverte traitant des déchets verts. Le bruit de fond de l'air a également été mesuré (Sanchez-Monedero and Stentiford, 2003).

Les trois principales activités sont : le broyage, le retournement et le criblage. Elles génèrent des bioaérosols et sont tous supérieurs au bruit de fond de l'air. L'émission la plus forte pour *Aspergillus fumigatus* a lieu lors du retournement suivi par la phase de broyage tandis que pour les bactéries mésophiles, la plus forte émission est observée lors du broyage des végétaux.

Lors d'une absence d'activité sur le site, la concentration sur le site est similaire à celle du bruit de fond de l'air.

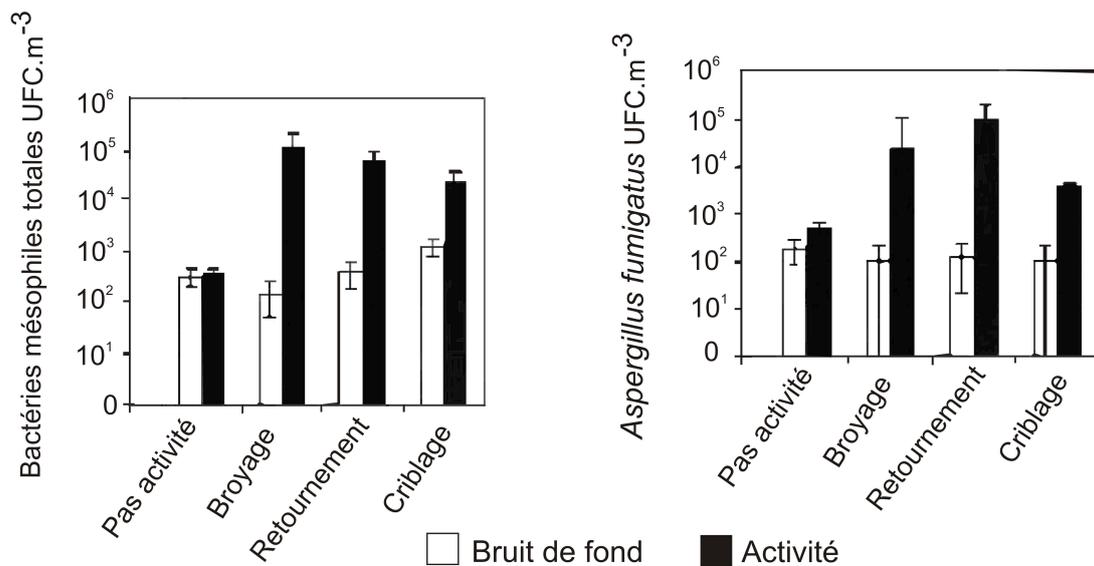


FIGURE 3.14 – Concentrations des bactéries mésophiles et d'*Aspergillus fumigatus* lors des différentes activités de compostage (Sanchez-Monedero and Stentiford, 2003)

Les concentrations microbiennes mesurées au sein des bioaérosols générés lors du retournement sur les sites de compostage sont indiquées dans le tableau 3.7. Les différentes études sont classées selon la nature des déchets (déchets verts, ordures ménagères, boues de station d'épuration). Il est difficile de comparer les résultats obtenus entre les différentes études, car les différences présentes peuvent être dues aux caractéristiques des sites (type de procédé, type de déchets et quantité traitée ...) mais également aux méthodes employées pour collecter les bioaérosols et pour les analyser (méthodes culturales).

Néanmoins, la concentration bactérienne au sein de ces différents bioaérosols de compostage émis est comprise entre 1×10^3 et 1×10^7 UFC m⁻³ et pour les champignons, elle varie entre 100 et 1×10^7 UFC m⁻³. En comparant les différentes émissions de bioaérosols lors du compostage de déchets verts, le site ouvert émet plus que les sites fermés (différence d'une unité logarithmique) (Sanchez-Monedero and Stentiford, 2003). Ces auteurs ont également observé que les concentrations varient en fonction du type de déchets, (les déchets verts émettent plus que les boues de stations d'épurations) mais également selon le procédé employé.

TABLEAU 3.7: Concentration microbienne au sein des bioaérosols émis sur les plates-formes de compostage

Types de déchets	Concentration (UFC m ⁻³)			Références
	Bactéries	Actinomycètes	Champignons	
– DÉCHETS VERTS				
Site fermé				
Déchets verts OM ¹ Cendres	> 1 × 10 ⁵	> 1 × 10 ⁵	> 1 × 10 ⁴	Wheeler et al., 2001
Déchets verts OM	M ² 1 × 10 ⁴		1 × 10 ⁵	Sanchez-Monedero et al., 2003
Site ouvert				
Déchets verts OM	> 1 × 10 ⁷	> 1 × 10 ⁴	> 1 × 10 ⁴	Wheeler et al., 2001
Déchets verts	> 1 × 10 ⁶	> 1 × 10 ⁵	> 1 × 10 ⁵	Wheeler et al., 2001
Déchets verts		1 × 10 ⁶ –1 × 10 ⁷	1 × 10 ⁶ –1 × 10 ⁷	Taha et al., 2006
Déchets verts Boues de STEP ⁴		T ³ 10–1 × 10 ⁴	7–1 × 10 ⁴	Millner et al., 1980
Déchets verts	Gram négatif 100–1 × 10 ³		100–1 × 10 ⁵	Van der Werf et al., 1996
Déchets verts	1 × 10 ⁴ Gram positif 1 × 10 ³ Gram négatif 1 × 10 ³	200	1 × 10 ³	Hryhoreczuk et al., 2001
Déchets verts OM	retournement : M 1 × 10 ⁵ broyage : M 1 × 10 ⁵	retournement : 1 × 10 ⁵ broyage : 1 × 10 ⁴		Sanchez-Monedero et al., 2003

Types de déchets	Bactéries	Concentration (UFC m ⁻³)		Références
		Actinomycètes	Champignons	
	criblage : M 1 × 10 ⁴			<i>Aspergillus fumigatus</i>
Déchets verts	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁵	Herr et al., 2003
Déchets verts	> 1 × 10 ⁴			Fracchia et al., 2006
Déchets verts	1 × 10 ³ -1 × 10 ⁴			Nikaeen et al., 2009
- ORDURES MÉNAGÈRES				
Site fermé				
OM	1 × 10 ⁴	1 × 10 ³	8 × 10 ³	Tolvanen et al., 1999
Déchets verts				
OM	1 × 10 ⁴		1 × 10 ³	Heida et al., 1995
	Gram négatif 1 × 10 ³ -1 × 10 ⁴			
OM	1 × 10 ⁴		1 × 10 ⁴	Marchand et al., 1995
	Gram négatif 1 × 10 ⁴			
OM	100-1 × 10 ⁴		100-1 × 10 ⁴	Delaunay et al., 1997
	Gram négatif 100-1 × 10 ³			
OM				
Déchets verts				1 × 10 ⁶ -1 × 10 ⁷
OM	M 1 × 10 ⁴			Fisher et al., 1999
Boues STEP				1 × 10 ⁵
Déchets verts				Sanchez-Monedero et al., 2003
OM	M 1 × 10 ⁵			
Déchets verts				1 × 10 ⁴
OM	M 1 × 10 ⁴			Sanchez-Monedero et al., 2003
Boues STEP				1 × 10 ⁴
				Sanchez-Monedero et al., 2003

Types de déchets	Concentration (UFC m ⁻³)		Références
	Bactéries	Actinomycètes	
Déchets verts			
OM	M 1×10^5		Sanchez-Monedero et al., 2003
OM	$1 \times 10^5 - 1 \times 10^7$		Albreicht et al., 2007
Déchets verts			
OM	med ⁵ 4×10^5	champignons et levures : med 7×10^4	Reinthal et al., 1997
OM	med $> 5 \times 10^5$	champignons et levures : med 1×10^5	Reinthal et al., 1997
Site ouvert			
OM	$1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$	$1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$	Van Tongeren, 1997
Mesure du personnel	Gram négatif $1 \times 10^3 - 1 \times 10^5$		
OM	Gram négatif $1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$	$1 \times 10^4 - 1 \times 10^8$	Lacey, 1991
aération forcée			
OM	M $10 - 1 \times 10^4$	M $100 - 1 \times 10^5$ T $10 - 1 \times 10^4$	Tolvanen et al., 1998
Déchets verts			Fisher et al., 1998
Déchets verts			
OM		M $1 \times 10^4 - 1 \times 10^7$ Tm ⁶ $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$	Fisher et al., 2000
Déchets verts		champignons et levures : med 1×10^5	Reinthal et al., 1997
OM	med $> 3 \times 10^4$		

Types de déchets	Concentration (UFC m ⁻³)		Références
	Bactéries	Champignons	
– BOUES DE STEP			
Site fermé			
Boues STEP		0–1 × 10 ³	Epstein et al., 2001
Déchets verts			
Boues STEP	1 × 10 ⁴	M 1 × 10 ³ T 1 × 10 ³	Chiang 2003
Boues STEP	M 1 × 10 ³		
Déchets verts		1 × 10 ⁴	Sanchez-Monedero et al., 2003
Site ouvert			
Boues STEP	Gram négatif 0–1 × 10 ⁵		
OM		100–1 × 10 ⁶	Clark et al., 1983

¹ Ordures ménagères; ² mésophile; ³ thermophile

⁴ Station d'épuration; ⁵ médiane; ⁶ thermotolérants

Les différentes activités (retournement, criblage et broyage) sont génératrices de bioaérosols. Maintenant comparons ces émissions avec celles mesurées dans des environnements non soumis aux activités de compostage. L'étude de Hryhorczuk *et al.* a consisté à dénombrer les bactéries ainsi que les champignons sur les plates-formes de compostage et dans l'environnement (tableau 3.8) (Hryhorczuk et al., 2001).

On constate qu'en analysant une cinquantaine d'échantillons, la concentration moyenne des micro-organismes sur les plates-formes de compostage est plus élevée que celle de l'air, principalement observée pour les actinomycètes ainsi que les genres fongiques *Aspergillus*–*Penicillium*, sauf pour les spores de *Cladosporium*. Les auteurs se sont également intéressés à l'émission sur site lors d'une absence d'activité, et d'une activité retournement. La concentration bactérienne et fongique cultivables augmentent d'une unité logarithmique avec l'activité.

TABLEAU 3.8 – Comparaison entre les concentrations en micro-organismes dans l'air et celles mesurées sur des plates-formes de compostage (Hryhorczuk et al., 2001)

	Bruit de fond			Sites		
	min ¹	moy ²	max ³	min	moy	max
Nombre d'échantillons		55			54	
Bactérie						
UFC m ⁻³						
Totales	160	$3,2 \times 10^3$	$1,7 \times 10^4$	480	$1,2 \times 10^3$	$7,8 \times 10^4$
Gram négatif	0	$1,6 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	240	$5,5 \times 10^3$	$4,1 \times 10^4$
Gram positif	160	$1,5 \times 10^3$	$7,4 \times 10^3$	240	$6,7 \times 10^3$	$4,3 \times 10^4$
Actinomycètes	0	94	$1,2 \times 10^3$	0	200	$1,5 \times 10^3$
Nombre d'échantillons		27			10	
Champignons						
spores m ⁻³						
spores totales	240	$1,8 \times 10^4$	$9,4 \times 10^4$	$5,2 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$
<i>Aspergillus-Penicillium</i>	0	300	1×10^3	110	$3,2 \times 10^3$	$8,7 \times 10^3$
<i>Basidiospores</i>	0	700	$4,7 \times 10^3$	500	$1,7 \times 10^3$	$4,2 \times 10^3$
<i>Cladosporium</i>	90	$4,5 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	0	700	$3,6 \times 10^3$

¹ minimum, ² moyenne, ³ maximum

En 2008, Fischer *et al.* ont mesuré la concentration microbienne en amont et lors du retournement des andains d'ordures ménagères sur deux plates-formes de compostage et ceci par des techniques culturales (Fischer et al., 2008). Les concentrations sont présentées dans le tableau 3.9.

TABLEAU 3.9 – Concentration microbienne en amont et lors de l'activité de retournement sur deux plates-formes de compostage (Fischer et al., 2008)

Plates-formes traitant	Point de collecte	Concentration en UFC m ⁻³			
		Champignons à 25°C	à 45°C	Bactéries à 36°C	Actinomycètes à 50°C
OM ¹					
Résidus industriels tunnels fermés					
1 ^{er} prélèvement	Amont	5 × 10 ³	10	100	10
	55 m de la source				
	Retournement	1 × 10 ⁴	1 × 10 ⁴	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁵
2 ^e prélèvement	Amont	1 × 10 ³	10	100	50
	120 m de la source				
	Retournement	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁵	1 × 10 ³
OM					
Résidus industriels site ouvert					
2 ^e prélèvement	Amont	1 × 10 ³	10	100	100
	130 m de la source				
	Retournement :				
	- Avant	5 × 10 ³	5 × 10 ³	1 × 10 ⁴	5 × 10 ³
	- Pendant	1 × 10 ⁶	5 × 10 ⁵	1 × 10 ⁶	5 × 10 ⁵
	- Après	nd ²	5 × 10 ³	1 × 10 ⁴	5 × 10 ³

¹ Ordures ménagères; ² non déterminé

Il en ressort que la concentration bactérienne lors du retournement est supérieure à celle de l'amont de plus de 3 à 4 unités logarithmiques. La concentration bactérienne pour les deux sites lors du retournement est de l'ordre de 1 × 10⁶ UFC m⁻³. Pour les champignons cultivés à 25°C, la différence de concentration entre le retournement et l'amont est de 1 à 2 unités logarithmiques. Par contre elle est de 2 à 4 unités logarithmiques pour ceux cultivés à 45°C. Les champignons thermophiles sont dénombrés sur les milieux de culture incubés à 45°C.

Les mesures effectuées sur le second site, avant, pendant et après le retournement montrent une augmentation des différents paramètres étudiés lors du retournement (concentration comprise entre 1×10^5 et 1×10^6 UFC m^{-3}). Après le retournement, la concentration est similaire à celle détectée avant l'activité (de l'ordre de 1×10^4 UFC m^{-3}). Ces concentrations étaient supérieures à celles du point amont (différence de 2 unités logarithmiques pour les bactéries, les actinomycètes et les champignons cultivés à 45°C et une différence d'une unité logarithmique pour les champignons cultivés à 25°C).

3.6.2.3.3 La diversité microbienne des bioaérosols

Jusqu'en 2009, la diversité microbienne des bioaérosols de compostage n'a pas été étudiée dans son ensemble, les études se focalisaient sur la quantification par des techniques culturales de groupes donnés (cf : tableau 3.7) :

- pour les bactéries : les bactéries totales, les bactéries Gram négatif, les bactéries Gram positif, les bactéries mésophiles et les actinomycètes
- pour les champignons : les champignons totaux, les champignons thermophiles et *Aspergillus fumigatus*

Néanmoins en 2005, Tolvanen *et al.* ont étudié la diversité fongique dans le bioaérosols émis lors de la réception des déchets ménagers ainsi que lors du retournement (Tolvanen *et al.*, 2005). L'identification des genres fongiques a été réalisée par l'emploi de techniques culturales ainsi que par microscopie (tableau 3.10).

TABLEAU 3.10 – Fréquence en pourcentage des genres fongiques identifiés dans les bioaérosols émis dans la zone de réception et lors du retournement (Tolvanen *et al.*, 2005)

Genres fongiques identifiés	Zone de réception des déchets	Zone de retournement
<i>Penicillium</i>	61	54
<i>Aspergillus</i>	19	28
<i>Cladosporium</i>	0,8	6
<i>Geotrichum</i>	0,8	-
<i>Rhizopus</i>	0,5	-
<i>Paecilomyces</i>	-	0,5
<i>Mucor</i>	0,4	-
<i>Scopulariopsis</i>	0,4	-

Dans les deux zones, les genres *Penicillium* et *Aspergillus* dominant. *Aspergillus* est plus représenté dans la zone de retournement que dans celle de réception des déchets. Des espèces qui n'avaient pas été identifiées dans la première zone sont détectées lors du retournement, c'est le cas pour le genre *Paecilomyces* et à l'inverse des espèces qui ont été détectées dans la zone de réception ne le sont plus lors du retournement (*Geotrichum*,

Rhizopus, *Scopulariopsis* et *Mucor*).

Bru-Adan *et al.* ont utilisé des outils moléculaires pour décrire la diversité microbienne des bioaérosols de compostage (Bru-Adan *et al.*, 2009). Les auteurs ont caractérisé la diversité microbienne d'un compost de déchets verts en cours de criblage alors qu'il était en phase de maturation. La répartition des phyla bactériens et fongiques est présentée dans le tableau 3.11.

TABLEAU 3.11 – Répartition en pourcentage des phyla bactériens et fongiques au sein d'un bioaérosol de compostage collecté lors du criblage d'un compost de déchets verts en stade maturation (Bru-Adan *et al.*, 2009)

Répartition des phyla microbiens dans un bioaérosol de compostage (en %) ¹	
Phyla bactériens	n=171 séquences
<i>Firmicutes</i>	46
<i>Actinobacteria</i>	28
<i>α-Proteobacteria</i>	10
<i>β-Proteobacteria</i>	4
<i>γ-Proteobacteria</i>	3
<i>Bacteroidetes</i>	6
<i>Cyanobacteria</i>	2
<i>Chloroflexi</i>	2
Phyla fongiques	n=78 séquences
<i>Ascomycota</i>	17
<i>Basidiomycota</i>	59
<i>Oomycetes</i>	11
<i>Zygomycetes</i>	8
nd ²	5

¹ du nombre total de séquences bactériennes ou fongiques

² non déterminé

Les 171 séquences analysées se répartissent en 85 phylotypes bactériens inclus dans 8 phyla tandis que les séquences fongiques sont incluses dans 39 phylotypes et 4 phyla. Deux phyla bactériens dominent dans le bioaérosol de compostage étudié, il s'agit du phylum *Firmicutes* et *Actinobacteria*, concernant les champignons, le phylum *Basidiomycota* est le plus représenté. Les principaux genres identifiés au sein du bioaérosol émis sont :

- pour les bactéries : *Thermobifida* (15% des séquences totales bactériennes) affiliée au phylum *Actinobacteria*, le genre *Thermoactinomyces* (14%) affiliée au phylum *Firmicutes*.
- pour les champignons : le genre le plus représenté est *Clitocybe* (10% des séquences fongiques) affilié au phylum *Basidiomycota*. Le genre *Aspergillus* issu des *Ascomycota* représente 9% des séquences de l'inventaire. L'espèce *Aspergillus fumigatus* représente 6% des séquences fongiques.

Le genre majoritaire au sein des eucaryotes est le genre *Phytophthora*, il représente 12%. Ce genre est affilié aux *Oomycetes* issus des *Stramenopiles*.

Les genres bactériens et fongiques majoritaires dans cet inventaire ont déjà été identifiés dans le compost (Anastasi et al., 2005; Blanc et al., 1999, 1997; Cahyani et al., 2004; Dees and Ghiorse, 2001; Herrmann and Shann, 1997; Partanen et al., 2010; Ryckeboer et al., 2003b; Strom, 1985; Swan et al., 2003; Yamada et al., 2008).

La concentration bactérienne a été dénombrée par culture, les résultats se situent entre 1×10^3 et 3×10^4 UFC m^{-3} tandis que pour les champignons la concentration est comprise entre 100 et 5×10^3 UFC m^{-3} . Le ratio de cultivabilité se calcule en effectuant le rapport entre la valeur obtenue par dénombrement par la culture sur la valeur obtenue par microscopie. Il est de l'ordre de 1 à 2%. Ceci signifie que seulement 1% des microorganismes présents dans l'aérosol étudié est cultivable. Cette valeur est en accord avec les ratios obtenus par Peccia *et al.* dans d'autres environnements air (Peccia and Hernandez, 2006).

3.6.2.3.4 La dispersion des bioaérosols

Les bioaérosols générés par les différentes activités liées au procédé de compostage se dispersent aux alentours de la plate-forme (figure 3.15 issue de (Fischer et al., 2008)). La concentration bactérienne en amont des deux sites est similaire, 100 UFC m^{-3} , tandis que la concentration fongique cultivée à 25°C est plus variable (1×10^3 pour le site 2 et 5×10^3 UFC m^{-3} pour le site 4). Il en est de même pour celle des actinomycètes (10 – 100 UFC m^{-3}), à l'inverse la concentration des champignons cultivés à 45°C en amont des plates-formes est faible 10 UFC m^{-3} pour les deux sites. Ceci permet de dire qu'il y a peu de champignons thermophiles dans l'environnement des sites de compostage.

En aval de la source d'émission, à partir de 200 – 300 m une forte décroissance est observée, diminution de la concentration au sein des bioaérosols de 2 à 3 unités logarithmiques pour le site 2 et seulement 1-2 unités logarithmiques pour le site 4. Pour le site 4, la concentration microbienne présente dans le bioaérosol revient à celle du bruit de fond de l'air à partir de 600 m de la source d'émission. Pour le site 2, la concentration des

champignons cultivés à 25°C revient à celle du bruit de fond de l'air dès 200 m. La concentration des bactéries et des actinomycètes émis par l'activité de retournement est similaire à celle de l'environnement à une distance de 800 m. La concentration des champignons cultivés à 45°C est toujours équivalente à celle de l'environnement après une distance de $1,5 \times 10^3$ m. Les différents paramètres pouvant avoir une incidence sur la dispersion sont : le vent, la température, l'hygrométrie et les caractéristiques de la plate-forme de compostage de même que le procédé employé.

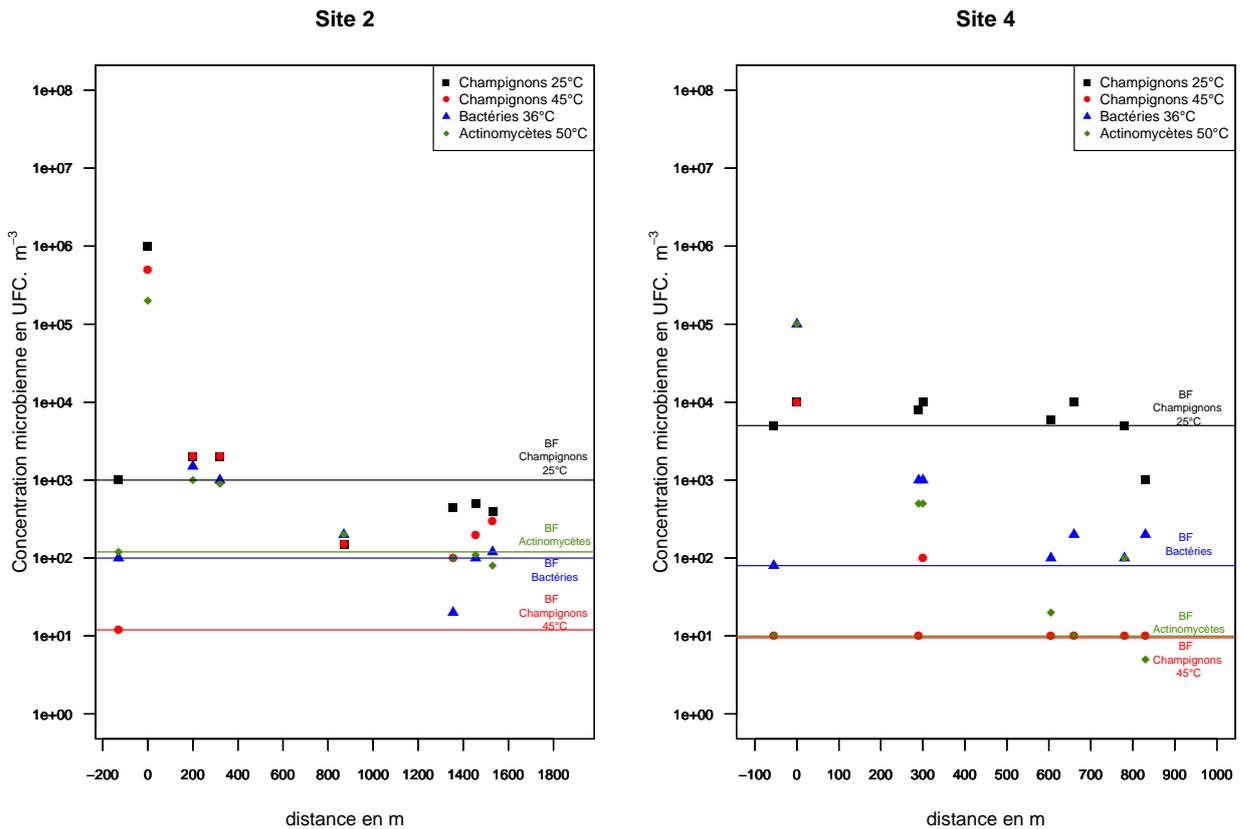


FIGURE 3.15 – Concentration des micro-organismes dans les bioaérosols générés lors d'une activité de retournement sur deux plates-formes de compostage traitant des ordures ménagères (Fischer et al., 2008). Les distances sont mesurées à partir de la source d'émission (point 0), les valeurs négatives représentent le point amont. Ce point amont sert de référence, car il n'est pas soumis à l'influence de la plate-forme de compostage. Les lignes représentent le bruit de fond de l'air (noté BF) déterminées en fonction de la concentration mesurée en amont de la source d'émission pour chacun des paramètres

La dispersion des bioaérosols a été également déterminée par l'utilisation de modèles mathématiques de dispersion. Les modèles les plus employés sont de type Gaussien. Différentes variables interviennent dans le modèle comme : la concentration à la source, le volume d'émission, la vitesse du vent, la superficie de l'andain, les conditions météorologiques

Il existe peu d'études sur la modélisation de la dispersion des bioaérosols de compostage. Le premier modèle de dispersion date de 1980, Millner *et al.*, ont modélisé la dispersion d'*Aspergillus fumigatus* provenant d'une plate-forme de compostage de boues de stations d'épuration (Millner et al., 1980). En 2001, Wheeler *et al.*, ont étudié la dispersion des bioaérosols provenant de trois plates-formes de compostage en Angleterre (Wheeler et al., 2001). Les données collectées ont été modélisées par le modèle "SCREEN 3" (US-EPA) qui est un modèle de type Gaussien. Le modèle sur-estime la concentration en aval par rapport aux données observées. L'hypothèse pour expliquer cette différence est que le modèle ne prend pas en compte la distribution des tailles des particules dispersées.

Taha *et al.*, ont également utilisé le modèle "SCREEN 3" pour connaître la dispersion d'*Aspergillus fumigatus* provenant de sites de compostage de déchets verts . Avec le modèle, leur concentration présente dans le bioaérosol de compostage est similaire à celle du bruit de fond de l'air pour une distance inférieure à 250 m (Taha et al., 2005, 2006, 2007).

Un autre biais des modèles de dispersion nécessite la connaissance du volume d'émission de la source (Swan et al., 2003). Il est difficile de modéliser la dispersion d'un andain lorsque le site est ouvert car il y a toujours de l'activité, les andains ne sont pas tous au même stade de fermentation ou de maturation, la nature des déchets évolue au cours de l'année (notamment pour les déchets verts). Ces différents paramètres influent sur la composition microbienne présente dans le compost et également sur l'estimation du flux émis.

Le tableau 3.12 répertorie les études indiquant à quelle distance de la source d'émission la concentration microbienne du bioaérosol est similaire à celle du bruit de fond de l'air.

TABLEAU 3.12 – Distance à partir de laquelle le bioaérosol de compostage est similaire au bruit de fond de l'air

Plate-forme de compostage Paramètre suivi dans le bioaérosol	Distance depuis	Concentration du bruit de fond de l'air UFC m ⁻³	Distance où bioaérosol même concentration que bruit de fond de l'air (en mètre)	Remarques	Références
Déchets verts					
<i>Aspergillus fumigatus</i>	andain	400	500	modèle	Danneberg et al., 1997
<i>Aspergillus fumigatus</i>	andain	1×10^3	< 250	modèle	Taha et al., 2006
Ordures ménagères					
<i>Aspergillus fumigatus</i>	andain	20	100		Lavoie et al., 1997
Bactéries mésophiles	andain	$2,3 \times 10^3$	100	1×10^4 ⁽¹⁾	Lavoie et al., 1997
Bactéries mésophiles	andain	1×10^3	200		Sanchez-Monedero et al., 2005
<i>Aspergillus fumigatus</i>	andain	100	200		Sanchez-Monedero et al., 2006
Boues de STEP					
<i>Aspergillus fumigatus</i>	andain	0-24	500	modèle	Millner et al., 1980
Bactéries	site	180	$1,2 \times 10^3 - 1,5 \times 10^3$	modèle	Chiang et al., 2003
Champignons mésophiles	site	710	$1,5 \times 10^3 - 1,8 \times 10^3$	modèle	Chiang et al., 2003
Champignons thermophiles	site	14	$1,5 \times 10^3$	modèle	Chiang et al., 2003
<i>Aspergillus fumigatus</i>	site	12	$1,5 \times 10^3$	modèle	Chiang et al., 2003

¹ recommandation limite supérieure pour les plates-formes de compostage au Québec

Au delà de 200–250 m, les bioaérosols émis par les plates-formes de compostage ne sont pas différenciables du bruit de fond de l'air (Sanchez-Monedero et al., 2005; Swan et al., 2003; Taha et al., 2005, 2006, 2007).

3.7 Réglementation française associée aux émissions atmosphériques des procédés de dépollution

Toute exploitation industrielle susceptible de créer des risques ou de provoquer des pollutions ou des nuisances, notamment pour la sécurité et la santé des riverains est une installation classée. Les activités relevant de la législation des installations classées sont énumérées dans une nomenclature qui les soumet à un régime de déclaration ou d'autorisation en fonction de l'importance des risques ou des inconvénients qui peuvent être engendrés (Source : <http://installationsclassees.ecologie.gouv.fr>) :

- **Déclaration** : pour les activités les moins polluantes et les moins dangereuses. Une simple déclaration en préfecture est nécessaire
- **Autorisation** : pour les installations présentant les risques ou pollutions les plus importants. L'exploitant doit faire une demande d'autorisation avant toute mise en service, démontrant l'acceptabilité du risque. Le préfet peut autoriser ou refuser le fonctionnement.
- **Enregistrement** : il s'agit d'un nouveau régime mis en place en 2009. Intermédiaire entre les régimes actuels d'autorisation et de déclaration, le régime d'enregistrement a pour objectif de réduire de moitié les délais de délivrance des autorisations et de simplifier les dossiers à fournir par les industriels. Ce régime permet une meilleure protection de l'environnement (prévention des pollutions ou de risques les plus importants). L'enregistrement est réservé à certaines activités dont le compostage.

Les installations classées pour la protection de l'environnement soumises à autorisation doivent effectuer une étude d'impact et de danger.

L'étude d'impact contient une analyse de l'état initial du site et de son environnement, une analyse des effets directs et indirects, temporaires et permanents de l'installation sur l'environnement et la santé (la faune et la flore, les milieux naturels, sur la commodité du voisinage (bruits, vibrations, odeurs, émissions lumineuses) . . .). Une analyse de l'origine, de la nature et de la gravité des inconvénients susceptibles de résulter de l'exploitation de l'installation considérée est effectuée. Cette étude doit indiquer les mesures envisagées par l'exploitant pour supprimer et/ou limiter et si possible compenser les inconvénients de l'installation ainsi que les conditions de remise en état du site.

L'étude d'impact doit permettre pour chacun des grands types de nuisances (pollution de l'eau, pollution de l'air, bruit, déchets. . .) de connaître la situation existante avant la mise en service de l'installation, ses caractéristiques et ses effets bruts sur l'environnement

pour chacune de ces nuisances, les mesures prises pour atténuer les effets, et la situation prévisible après mise en service.

L'étude de danger justifie que le projet permet d'atteindre, dans des conditions économiquement acceptables, un niveau de risque aussi bas que possible, compte tenu des connaissances et des pratiques et de la vulnérabilité de l'environnement de l'installation. Cette étude regroupe des informations qui permettent d'identifier les sources de risque, les scénarios d'accident envisageables et leurs effets sur les personnes et l'environnement (Source : <http://installationsclassées.ecologie.gouv.fr>).

3.7.1 Les centres de stockage des déchets ultimes

Les centres de stockage des déchets ultimes sont soumis à l'arrêté du 9 septembre 1997 ainsi qu'à la directive 1999/31/CE. Ils peuvent être également classés en ICPE, loi du 19 Juillet 1976 (Code de l'Environnement) et décret du 21 septembre 1977. Les installations doivent être éloignées d'au moins 200 m de toutes zones habitées. Selon la définition de la directive européenne 1999/31/CE du 26 avril 1999, le biogaz est défini ainsi "tous les gaz produits par les déchets mis en décharge". La réglementation actuelle impose la collecte du biogaz ainsi qu'un suivi des émissions de gaz, de pression et de composition de ce dernier. Le suivi du biogaz est semestriel. Un suivi du centre de stockage, après fermeture est obligatoire pendant une durée minimale de 30 ans.

3.7.2 Les plates-formes de compostage

Les plates-formes de compostage sont classées en trois catégories selon la production de compost journalière (tableau 3.13). Selon la catégorie dans laquelle se situe la plate-forme elle doit répondre aux différents critères énoncés. Les distances d'implantation fixées par la réglementation visent à limiter les impacts sur la ressource en eau ainsi que les émissions atmosphériques (odeurs, émissions chimiques), sauf que les bioaérosols émis ne sont pas pris en compte.

La notion de traitement d'effluents gazeux apparaît seulement dans la réglementation sur les ICPE (Installations Classées pour la Protection de l'Environnement) soumises à autorisation qui est la plus restrictive. De même toujours dans cette catégorie d'ICPE, le procédé de compostage est réglementé.

TABLEAU 3.13 – Les différentes contraintes selon la taille des plates-formes de compostage

Quantités de compost produites par jour	< 1 tonne	> 1 tonne mais < 10 tonnes	> 10 tonnes
Réglementation	Règlement sanitaire départementale Article 158 ¹ si volume des dépôts >50 m ³ déclaration en mairie	ICPE Déclaration arrêté du 7 janvier 2002 ²	ICPE Autorisation arrêté du 22 avril 2008 ³
Ordures ménagères			Compostage soumis obligatoirement à autorisation
Distance implantation			Aucune implantation dans le périmètre de protection rapproché d'un captage d'eau consommation humaine
	>10 m des fossés	>8 m entre les aires de travail et limite de propriété	>8 m entre les aires de travail et limite de propriété
	>35 m puits, forages, sources, aqueduc, des rivages, des berges installation d'eau potable	>35 m puits, forages, sources, aqueduc, des rivages, des berges installation d'eau potable	>35 m puits, forages, sources, aqueduc, des rivages, des berges installation d'eau potable
	>200 m zones destinées à l'habitation, zones de loisirs zones recevant du public zones de baignades et aquacoles	>100 m zones destinées à l'habitation, zones de loisirs zones recevant du public	>100 m installation composant des effluents d'élevage présente dans les exploitations agricoles
		>200 m zones de baignades	>200 m – plates-formes ouvertes avec traitement des effluents gazeux – plates-formes ouvertes ou fermées composant des matières d'origine animale – zones de baignades – Zones destinées à l'habitation
		>500 m zones de conchylicoles piscicultures	>500 m zones de conchylicoles piscicultures
Procédé de compostage			–aération effectuée par retournement 3 semaines de fermentation minimum Au moins 3 retournements 3 jours minimum entre chacun 55°C au moins pendant 72 heures –aération effectuée par aération forcée 2 semaines de fermentation minimum Au moins 1 retournement 55°C au moins pendant 72 heures

¹ relatif aux dépôts de matières fermentescibles destinées à la fertilisation des sols

² relatif aux prescriptions générales applicables aux installations classées soumises à déclaration sous la rubrique n°2170 : "engrais et supports de cultures (fabrication des) à partir de matières organiques" et mettant en œuvre un procédé de transformation biologique aérobie (compostage) des matières organiques.

³ fixant les règles techniques auxquelles doivent satisfaire les installations de compostage ou de stabilisation biologique aérobie soumises à autorisation en application du titre I^{er} du livre V du code de l'environnement

Récemment, la réglementation ICPE relative au compostage a été modifiée : anciennement classée dans la rubrique 2170 fixant les tonnages à plus d'une tonne et inférieure à 10 tonnes pour les ICPE soumises à déclaration et pour les ICPE soumises à autorisation pour un tonnage supérieur ou égal à 10 tonnes par jour. Le décret 2009-1341 du 29 octobre 2009 crée une nouvelle nomenclature ICPE (2780) spécifique aux installations de traitement aérobie des déchets non dangereux ou matière végétale brute (compostage).

La nouvelle classification des ICPE est :

1. Compostage de matière brute, effluents d'élevage, matières stercoraires :
 - supérieure ou égale à 30 tonnes par jour : autorisation
 - supérieure ou égale à 3 tonnes par jour et inférieure à 30 tonnes par jour : déclaration
2. Compostage de la fraction fermentescible des ordures ménagères, des déchets des industries agro-alimentaires, des boues de stations d'épuration
 - supérieure ou égale à 20 tonnes par jour : autorisation
 - supérieure ou égale à 2 tonnes par jour et inférieure à 20 tonnes par jour : déclaration

Le rayon d'affichage, indiquant la présence d'une installation de compostage est de 3 km. Actuellement 45 plates-formes de compostage en France (35 soumises à autorisation et 10 à déclarations) sont régies par la rubrique 2780 des ICPE (Source : <http://installationsclassees.ecologie.gouv.fr>). Néanmoins, les prescriptions techniques citées dans le tableau 3.13 restent applicables.

L'arrêté du 7 janvier 2002 fixe des valeurs maximales d'odeurs (mesurées par olfactomètre) en fonction de l'éloignement de l'installation par rapport aux "immeubles habités ou occupés par des tiers, aux stades, terrains de camping et établissements recevant du public". Le niveau d'une odeur, exprimé en unité d'odeur par mètre cube ($UO\ m^{-3}$), est défini comme étant le facteur de dilution qu'il faut appliquer à un effluent pour qu'il ne soit plus ressenti comme odorant par 50% des personnes constituant un échantillon de population. Le débit d'odeur est défini comme étant le produit du débit d'air rejeté exprimé en $m^3\ h^{-1}$ par le facteur de dilution au seuil de perception (tableau 3.14).

TABLEAU 3.14 – Valeurs maximales d'odeurs en fonction de l'éloignement de l'installation (arrêté du 7 janvier 2002)

Eloignement des tiers (m)	Niveau d'odeur sur site ($UO\ m^{-3}$)
100	250
200	600
300	2×10^3
400	3×10^3

Dans cette section, la réglementation française a été abordée, il faut savoir qu'il existe une réglementation pour les plates-formes de compostage en Angleterre. La zone d'influence des bioaérosols émis par les activités générées sur les plates-formes de compostage est de 250 m (Swan et al., 2003).

3.7.3 Les valeurs guides pour les bioaérosols

Il n'existe pas de valeurs guides concernant les micro-organismes dans l'atmosphère de travail. Les seules données disponibles sont des propositions faites par les auteurs, tableau 3.15 (Swan et al., 2003).

TABLEAU 3.15 – Valeurs guides proposées dans l'environnement de travail

	Valeurs guides		Références
Micro-organismes totaux	$1 \times 10^4 - 1 \times 10^5$	UFC m ⁻³	Dutkiewicz <i>et al.</i> , 1997 Lacey <i>et al.</i> , 1997 Markos <i>et al.</i> , 1992 Dutkiewicz <i>et al.</i> , 1997 Heida <i>et al.</i> , 1995 Poulsen <i>et al.</i> , 1995
Bactéries	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$	UFC m ⁻³	Rylander <i>et al.</i> , 1980-1983 Sigsgaard, 1990
Bactéries Gram négatif	$1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$	UFC m ⁻³	Dutkiewicz <i>et al.</i> , 1989 Lacey <i>et al.</i> , 1997 Rylander <i>et al.</i> , 1994 Markos <i>et al.</i> , 1992
Actinomycètes	$1 \times 10^4 - 1 \times 10^8$	UFC m ⁻³	Dutkiewicz <i>et al.</i> , 1997 Malmberg <i>et al.</i> , 1991
Actinomycètes thermophiles	2×10^4	UFC m ⁻³	Dutkiewicz <i>et al.</i> , 1989
Champignons	$1 \times 10^3 - 10^5$	UFC m ⁻³	Dutkiewicz <i>et al.</i> , 1997 Heida <i>et al.</i> , 1995 Rylander <i>et al.</i> , 1994
Endotoxines	10 – 100	ng m ⁻³	Hours <i>et al.</i> , 2003 ICOH ¹

¹ congrès international de la santé du travail

Par contre, des seuils réglementaires existent en France pour les poussières en milieu professionnel :

- Pour les poussières totales la valeur est de 10 mg m^{-3}
- Pour les poussières d'un diamètre inférieur à $5 \mu\text{m}$ le seuil est de 5 mg m^{-3} .

Les valeurs guides proposées par l'Organisation Mondiale de la Santé et du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France pour les poussières sont

- ne pas dépasser $120 \mu\text{g m}^{-3}$ d'exposition sur 24 heures
- ne pas dépasser sur l'année $70 \mu\text{g m}^{-3}$.

En conclusion de ce chapitre relatif aux bioaérosols émis sur les procédés de dépollution, il ressort que :

- La diversité microbienne des bioaérosols est mal connue
- La dispersion des bioaérosols aux alentours du site de traitement est peu évaluée
- Il n'y a pas de seuil lié aux bioaérosols émis dans la filière de dépollution. Les installations soumises aux différents régimes ICPE prennent en compte tous types de risques mais pour certains, il faut reconnaître qu'ils sont mal appréhendés.
- Il n'y a également pas de seuil d'exposition pour les travailleurs face aux bioaérosols, mais la réglementation du travail peut prévoir le port de protection individuelle (comme par exemple : lunettes, masques).

Techniques de collecte et d'analyse des bioaérosols

Sommaire

4.1	Méthode de collecte	157
4.1.1	L'impaction	157
4.1.1.1	L'impaction sur milieu solide	157
4.1.1.2	L'impaction sur support adhésif	160
4.1.1.3	L'impaction en milieu liquide	160
4.1.1.4	L'impaction centrifuge	161
4.1.2	La filtration	162
4.1.3	La sédimentation	163
4.1.4	Précipitation électrostatique	164
4.1.5	La collecte des virus	164
4.1.6	L'efficacité des collecteurs	164
4.2	La caractérisation des bioaérosols	168
4.2.1	Les méthodes chimiques	172
4.2.1.1	Détection des micro-organismes	172
4.2.1.2	Détection des endotoxines	173
4.2.1.3	Détection par PLFA	174
4.2.2	Les méthodes culturales	175
4.2.3	Les méthodes microscopiques	176
4.2.3.1	Comptage direct	177
4.2.3.2	Comptage par épifluorescence	177
4.2.3.3	La microscopie électronique	177
4.2.4	La cytométrie en flux	178
4.2.5	Les méthodes moléculaires	178
4.2.5.1	Amplification de l'ADN	178
4.2.5.2	L'ADN ribosomique	179

4.2.5.3 Les études des communautés	181
4.2.5.4 La quantification	184
4.2.6 Avantages et inconvénients des différentes techniques	188

4.1 Méthode de collecte

La collecte des bioaérosols consiste en une séparation des particules du fluide porteur, l'air, via différents mécanismes physiques (Renoux and Boulaud, 1998) :

- mouvement brownien et la sédimentation

Le mouvement brownien est une résultante de chocs entre les particules, son intensité s'accroît avec la température. Ce mouvement est applicable pour les particules inférieures à 1 μm . La sédimentation est un équilibre entre l'action de la pesanteur terrestre et la résistance du milieu (viscosité). Elle peut être déterminée par la loi de Stokes.

- diffusion turbulente et force d'inertie

Le déplacement d'une masse d'air peut être caractérisé soit par un régime laminaire soit par un régime turbulent. Cette distinction est quantifiée par le nombre de Reynolds (Re) (si $Re < 2000$ régime laminaire, si > 3000 régime turbulent).

Concernant les bioaérosols, un nombre de Reynolds de la particule (Re_p) a été défini, il permet de connaître selon la taille, dans quel régime, se trouvent les particules ($Re_p > 1$ régime turbulent). Leur inertie est observée lorsque le flux d'air change de direction, elle peut permettre l'impaction des particules.

- forces électriques

Les particules possèdent des charges électriques. Elles peuvent ainsi entraîner une déposition plus rapide.

- thermophorèse et photophorèse

La thermophorèse est le phénomène selon lequel les aérosols sont repoussés par les températures chaudes. Ils se déplacent vers les températures décroissantes. La photophorèse implique un rayon lumineux pouvant soit attirer les particules soit les repousser.

Il existe plusieurs techniques de collecte des bioaérosols qui sont détaillées ici

4.1.1 L'impaction

L'impaction permet de séparer les particules de l'air selon les propriétés d'inertie de ces dernières.

4.1.1.1 L'impaction sur milieu solide

Le principe de l'impaction sur milieu solide consiste à aspirer l'air et à le projeter directement sur un milieu nutritif gélosé.

Il existe différents types d'impacteurs, certains sont mono-étage tandis que d'autres sont multi-étages. Pour les impacteurs multi-étages l'air passe à travers une série d'étages permettant une sélection des particules, les plus grosses sont impactées sur les premiers étages tandis que les plus petites sont entraînées par le flux d'air et iront s'impacter dans les étages inférieures (figure 4.1) (Renoux and Boulaud, 1998). L'impaction dépend

de l'inertie des particules collectées (régie selon la taille, la viscosité et la vitesse) mais également par les propriétés physiques de l'impacteur lui-même (forme, dimensionnement, débit échantillonnage et vitesse du flux) (Nevalainen et al., 1992). L'impacteur multi-étages nous renseigne sur la distribution granulométrique de l'aérosol collecté.

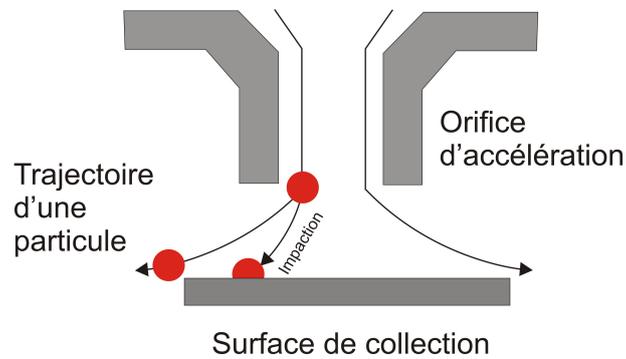


FIGURE 4.1 – Principe de l'impaction sur milieu solide

L'impacteur Andersen est multi-étages (six à huit étages). Les différents étages miment le tratus respiratoire de l'homme permettant ainsi de connaître où peuvent se disséminer les bioaérosols collectés (figure 4.2) (Andersen, 1958).

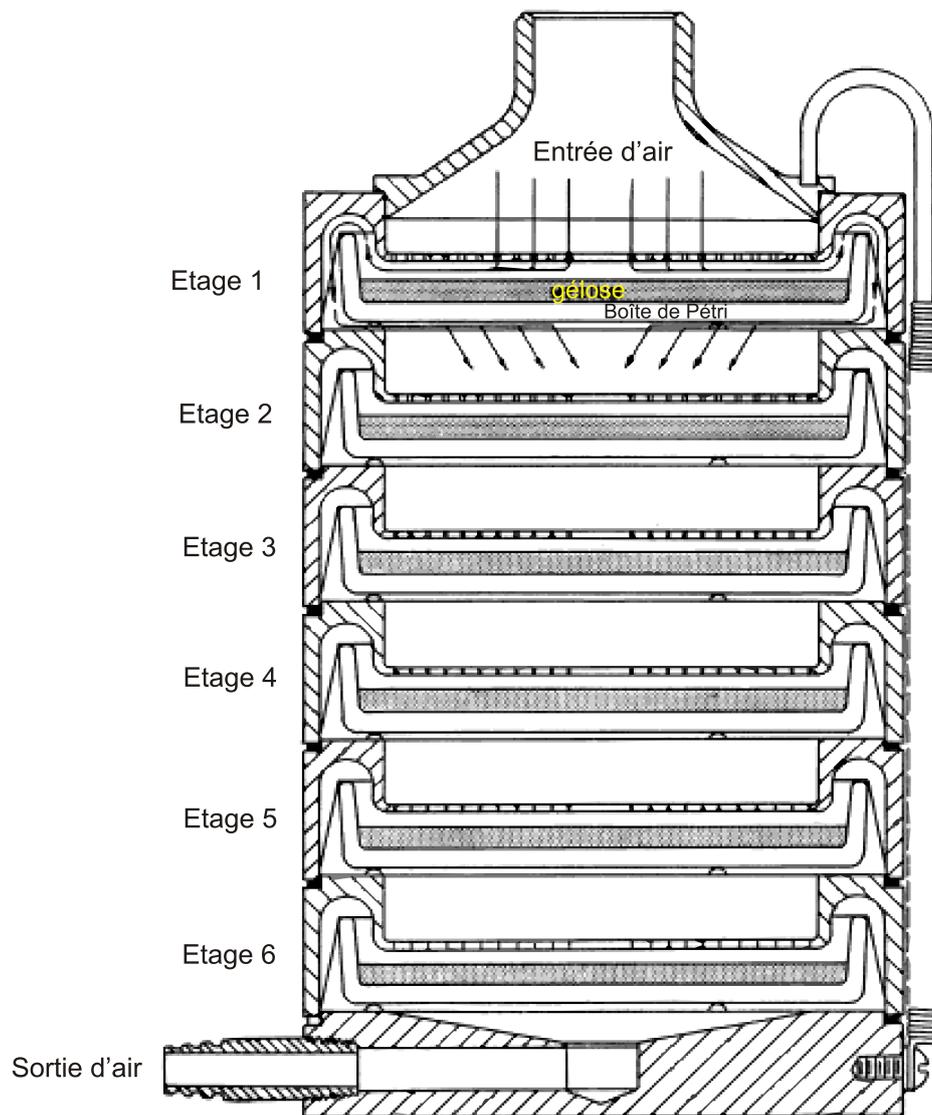


FIGURE 4.2 – Collecteur multi-étages Andersen, (Andersen, 1958)

La taille des particules collectées par les différents étages sont référencées dans le tableau 4.1. L'inconvénient de cette technique peut être la superposition de plusieurs colonies induisant des erreurs de dénombrement (Chen et al., 1998).

TABLEAU 4.1 – Les six étages de l'impacteur Andersen avec la correspondance avec le tractus respiratoire humain (<http://www.pacwill.ca/en/ProductsServices/6stage.htm>)

Etage	Taille des particules en μm	Partie du tractus respiratoire humain
1	> à 7	nez
2	5–7	pharynx
3	3–5	trachée
4	2–3	bronches
5	1–2	bronchioles
6	< à 1	alvéoles

Il existe d'autres impacteurs sur milieu solide mono-étage comme le Casella MK-II, le Mattson-Garvin, le New Brunswick, le SAS ("Surface Air System"), le MAS-100.

4.1.1.2 L'impaction sur support adhésif

Les impacteurs sur support adhésif permettent de capturer les spores et le pollen en continu dans l'air sur une semaine. L'air est aspiré à un débit de 10 L min^{-1} (correspond à la respiration humaine) à travers une fente (collecteurs Spore Traps, Burkard). Ce dispositif est équipé d'une girouette afin d'orienter l'entrée du capteur toujours face au vent. Les particules sont impactées sur une surface adhésive qui tourne à 2 mm h^{-1} . L'identification des champignons se fait au moyen d'une lecture microscopique directe des bandes adhésives (après découpe par tranche d'une journée). Il est possible d'observer l'évolution de l'émission de spores sur une période d'une semaine (Jaroz, 2004). L'identification est limitée à quelques genres de champignons dont les spores sont morphologiquement reconnaissables (*Alternaria*, *Dreschlera*, *Cladosporium*, *Ustilago*, *Epicoccum*...). Par contre pour les genres *Penicillium* et *Aspergillus*, leurs spores présentent une morphologie identique ainsi qu'une de taille similaire. Ce type de collecteur est utilisé pour la détection des spores (*Alternaria*, *Cladosporium* et du pollen allergisant (ambroisie, bouleau, graminées...) par le réseau national de surveillance aérobiologique (RNSA). La limite de ces appareils de collecte est qu'ils sont volumineux et lourds (supérieur à 10 kg).

4.1.1.3 L'impaction en milieu liquide

Il s'agit du même principe que précédemment sauf que l'air collecté est aspiré au travers d'un capillaire puis propulsé dans une solution de collecte qui est soit de l'eau stérile soit une solution physiologique. Pour les collecteurs AGI4 ou AGI30 ("All Glass Impinger"), l'air est aspiré horizontalement par un capillaire qui se courbe pour être perpendiculaire par rapport au fond de collecteur. La courbure représente le système nasal de l'homme

(CSTB, 2006).

Tandis que le Biosampler, similaire aux collecteurs AGI, sauf que les particules sont impactées tangentiellement à la surface de la solution de collecte. L'intérêt de cette impaction est de réduire le bullage (ré-aérosolisation) et aussi de limiter l'évaporation (CSTB, 2006).

Il existe également un impacteur multi-étages en milieu liquide, le MLI ("Multistage Liquid Impinger"). Il est composé de trois étages permettant le fractionnement de l'aérosol correspondant chez l'homme aux voies supérieures, aux bronches et aux alvéoles pulmonaires (CSTB, 2006).

4.1.1.4 L'impaction centrifuge

La collecte des particules se fait via la formation d'un vortex. Le principe est basé sur l'inertie des particules, en effet les particules ayant une inertie suffisante peuvent sortir du flux et s'impacter sur les parois ou sur une surface de collecte. L'échantillonneur RCS ("Reuter Centrifugal Sampler") de Biotest est un cyclone. L'air est collecté horizontalement et passe dans un cône où le vortex est créé. Les particules ont un trajet hélicoïdal descendant le long du cône. La paroi est recouverte d'une bande gélosée sur laquelle les particules s'impactent (figure 4.3). La bande est récupérée puis mise à incuber (CSTB, 2006). Les cyclones ont été améliorés et la collecte peut également s'effectuer dans une solution de collecte (exemple de collecteur le Coriolis).

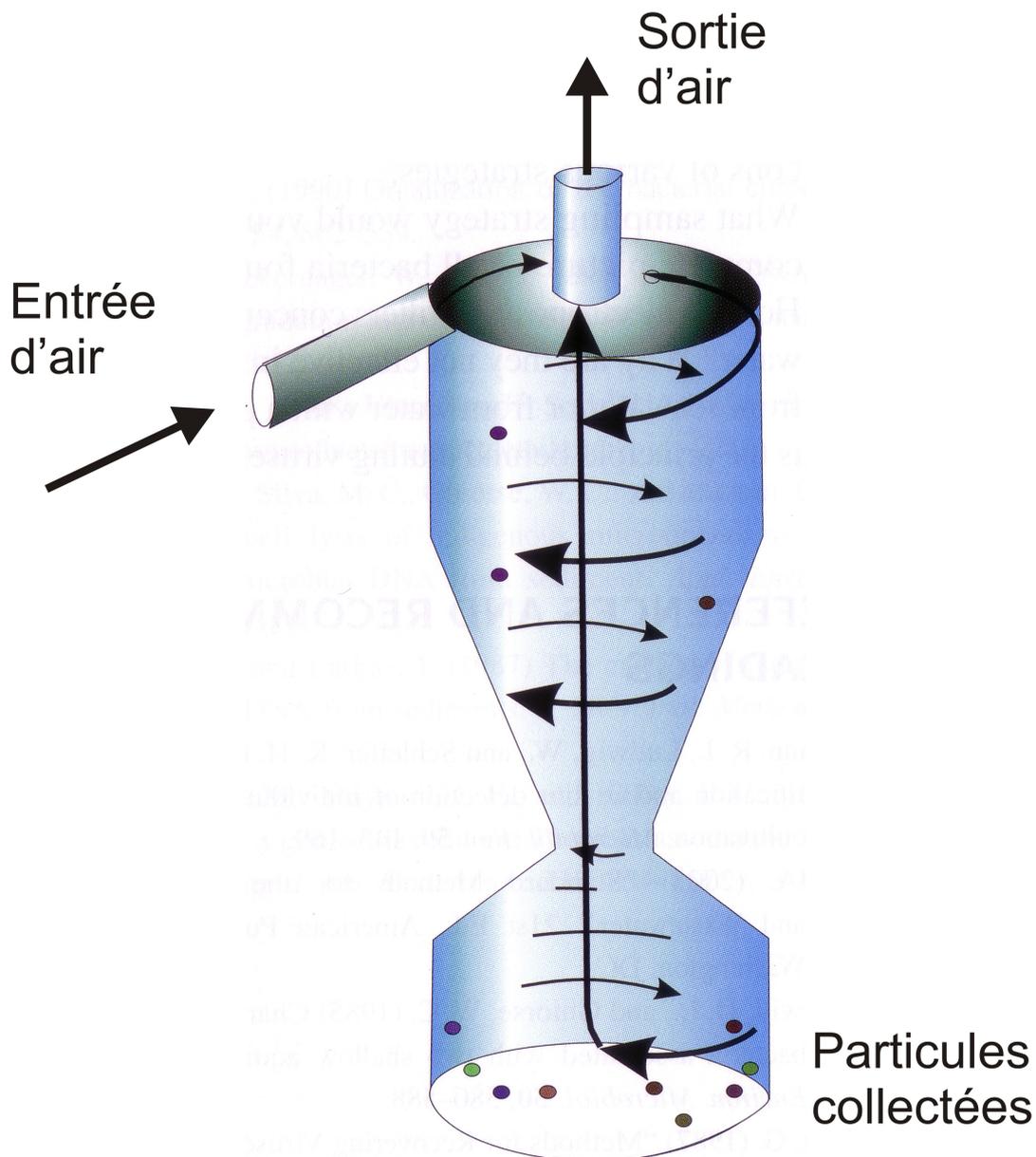


FIGURE 4.3 – Principe de l'impacteur centrifuge (Maier et al., 2009)

4.1.2 La filtration

Un flux d'air passe au travers d'un filtre retenant les micro-organismes et les particules à une taille donnée. L'efficacité de captage est fonction de la vitesse d'aspiration et également du diamètre des pores du filtre. La collecte des aérosols est due à une action simultanée de différents mécanismes qui sont l'impaction inertielle, l'interception et la diffusion (Duquenne and Greff-Mirguet, 2005).

La collecte peut s'effectuer à deux niveaux sur un filtre : à la surface ou à l'intérieur du filtre. Différents filtres sont employés, des filtres capillaires comme le polycarbonate ou des filtres poreux comme le filtre en fibre de verre.

Chacun de ces types de filtres ont leurs propriétés qui sont (CSTB, 2006) :

- Les filtres en fibres de verre

les particules sont interceptées au sein du maillage de fibres. Ils sont principalement

utilisés pour les analyses de poussières et d'allergènes (endotoxines).

- Les filtres membranaires (cellulose ou polymère synthétique)

Les particules sont recueillies soit à la surface soit à l'intérieur du filtre. La taille des pores mentionnée est un diamètre moyen car ces filtres sont constitués d'un maillage de fibres. Ces filtres sont utilisés avec le MD8 Sartorius.

- Les filtres en polycarbonate

La collecte sur ce type de filtre est réalisée uniquement à la surface. Ils ont l'avantage de permettre d'effectuer une détection directe (Palmgren et al., 1986). La taille des pores présent sur le filtre sont tous la même taille contrairement aux filtres membranaires.

L'analyse peut se faire soit directement sur le filtre, soit en utilisant des techniques culturales (Duquenne and Greff-Mirguet, 2005). Les filtres ont un effet sur la viabilité des micro-organismes collectés d'où l'importance du choix du filtre (Palmgren et al., 1986).

Ils peuvent être contenus dans des cassettes, notamment les filtres membranaires et les filtres en polycarbonate. Deux types de cassettes existent, les ouvertes permettant une répartition homogène et les fermées qui possèdent une ouverture de 4 mm (CSTB, 2006).

4.1.3 La sédimentation

Cette technique repose sur la propriété de sédimentation des particules. Des boîtes de Pétri ouvertes contenant un milieu de culture sont disposées dans la zone d'étude (figure 4.4). L'inconvénient de cette méthode, elle ne permet pas de déterminer le nombre de colonies associées à un volume d'air. Les grosses particules sédimentent plus rapidement (Sahu et al., 2005).



FIGURE 4.4 – Collecteur sédimentaire, (Sahu et al., 2005)

4.1.4 Précipitation électrostatique

L'échantillonnage des micro-organismes dans l'air peut s'effectuer par précipitation électrostatique. Les micro-organismes possèdent une charge électrique. Cette technique permet la collecte des aérosols sur un disque rotatif de charge opposée à celle des aérosols microbiens (Mainelis, 1999; Mainelis et al., 2005). Cette technique est peu documentée et peu utilisée.

En conclusion, les méthodes de prélèvement des aérosols vont différer selon le type d'analyses qui seront effectuées soit par des outils moléculaires soit par des méthodes culturales.

L'utilisation d'impacteur sur milieu gélosé est très souvent employé avec des méthodes culturales. Par contre, la filtration, la collecte cyclonique sont préférentiellement couplées avec une analyse moléculaire.

4.1.5 La collecte des virus

Les virus ont en général une taille inférieure à 200 nm. Ces particules sont fortement soumises aux mouvements Brownien. Les techniques de collecte sont principalement l'impaction soit en milieu liquide, soit en milieu solide. Les impacteurs cycloniques ont une efficacité de collecte de 50% pour des particules de tailles inférieures à 0,77 μm à un débit de 50 L min^{-1} (Verreault et al., 2008). Les collecteurs cycloniques sous-estiment la concentration virale dans l'air, les virus subissent des stress et des dommages structuraux lors de la collecte (Verreault et al., 2008). La détection des virus s'effectue principalement par l'infection des cellules bactériennes. Le dénombrement est exprimé en PFU (unité formant plaque de lyse).

4.1.6 L'efficacité des collecteurs

L'efficacité d'échantillonnage est la probabilité qu'une particule de l'aérosol présente dans l'air soit collectée. De manière générale l'efficacité est dépendante de l'efficacité physique (l'appareil utilisé, les propriétés des bioaérosols, le régime d'écoulement de l'air...) et de l'efficacité biologique qui est la viabilité des micro-organismes collectés. En effet, ils sont soumis aux stress (dessiccation, vitesse élevée...).

Les théories en physique des aérosols sont établies à partir des particules sphériques tandis que dans l'air, elles présentent différentes formes et diamètres :

- Le diamètre aérodynamique

C'est le diamètre d'une sphère ayant la même vitesse de chute que la particule et une masse égale à 1 g cm^{-3} . Il est noté d_a

- Le diamètre du volume équivalent

C'est le diamètre de la sphère possédant la même masse que la particule, noté d_{ev}

L'efficacité de collecte est exprimée en fonction du diamètre aérodynamique des particules. Le diamètre de coupure d_{50} du biocollecteur est défini comme étant le diamètre d'aérodynamique de la particule pour lequel 50% des particules sont collectées. Afin d'obtenir un prélèvement efficace, il faut choisir un collecteur dont le diamètre de coupure est inférieur à la taille des micro-organismes visés. Le tableau 4.2 recense différents diamètres de coupure pour quelques biocollecteurs (CSTB, 2006).

L'efficacité de captage est dépendante du dimensionnement de l'orifice d'entrée du biocollecteur, mais également de l'écoulement. La condition d'isocinétisme, c'est à dire dans des conditions idéales, est remplie quand la vitesse du flux d'air ambiant est égale à celle présente au niveau de l'orifice de captage du biocollecteur. Ceci est définie selon le rapport (R) de la vitesse du fluide en amont de l'orifice sur la vitesse dans l'orifice (figure 4.5).

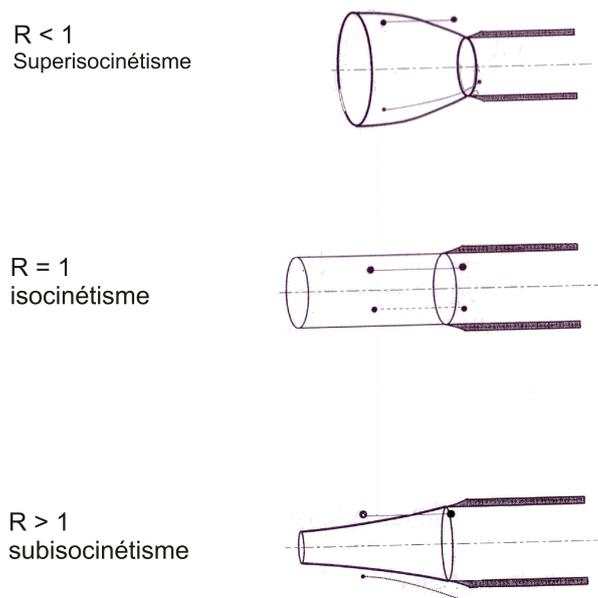


FIGURE 4.5 – Représentation de l'influence de l'écoulement d'air sur le processus de captage des bioaérosols (Renoux and Boulaud, 1998)

- Si $R = 1$ on est en condition d'isocinétisme
- Si $R < 1$ l'échantillonnage est sous-estimé car le flux est perturbé par un rétrécissement (condition superisocinétisme)
- Si $R > 1$ l'échantillonnage est sur-estimé car le flux est perturbé par un élargissement (condition subisocinétisme)

TABLEAU 4.2 – Diamètre de coupure de différents biocollecteurs (CSTB, 2006)

Biocollecteurs	Diamètre de coupure d_{50} en μm	
	Théorique	Mesuré
Impacteur solide		
Andersen 6 étages		
Etage 1	6,24	7
Etage 2	4,21	4,7
Etage 3	2,86	3,3
Etage 4	1,84	2,1
Etage 5	0,94	1,1
Etage 6	0,58	0,65
Andersen 2 étages		
Etage 1	6,28	8
Etage 2	0,83	0,95
Andersen 1 étage ¹	0,58	0,65
MAS-100	1,72	nd ²
SAS	1,97	2
Burkard spore	3,7	nd
Impacteur liquide		
AGI-30	0,3	
Bio-sampler	nd	< 0,3
MLI	nd	
Etage 1	nd	6
Etage 2	nd	3,3
Etage 3	nd	0,5
Impacteur centrifuge		
RCS standard	7,5	3,8
RCS plus	nd	0,82
Coriolis	nd	0,5

¹ équivalent à l'étage 6; ² non déterminé

Lors d'un prélèvement effectué avec un vent à 5 m s^{-1} , le nombre de particules supérieures à $10 \mu\text{m}$ peut être sur-estimé de 50% pour les impacteurs (Willeke et al., 1998). Tandis qu'avec un collecteur Andersen, positionné perpendiculairement au vent, moins de 5% des particules de $10 \mu\text{m}$ sont collectées. Concernant les systèmes de filtrations, lorsqu'ils sont positionnés dans le sens de l'écoulement de l'air, un sur-échantillonnage est observé (Cox and Wathes, 1995).

Un autre paramètre à prendre en compte pour l'efficacité est le phénomène de ré-aérosolisation, concernant principalement les impacteurs en milieu liquide. Ce phénomène est lié à l'agitation de la solution de collecte lorsque les aérosols collectés tombent dans cette solution (formation de gouttelettes) (Grinshpun et al., 2007; Lin et al., 2000). Pour les impacteurs multi-étages, l'efficacité peut être modifiée car les particules peuvent rebondir au lieu de s'impacter.

Pour les impacteurs en milieu solide, le temps de collecte et le débit d'air entrant sont faibles, de l'ordre de 30 L min^{-1} pour éviter d'entraîner une déshydratation des milieux gélosés, de même qu'une saturation des géloses.

Le fait de collecter par impaction en milieu liquide, permet de s'affranchir de la déshydratation. Les débits sont plus importants peuvent atteindre 1000 L min^{-1} . Pour un temps donné, les impacteurs cycloniques avec un débit de 300 L min^{-1} , collecte 10 fois plus d'air qu'un impacteur solide (Andersen) ayant un débit de 30 L min^{-1} . Les temps de collecte ne dépassent pas les trente minutes car la solution de collecte s'évapore (Grinshpun et al., 2007; Lin et al., 1997; White et al., 1975). Pour pallier à l'évaporation certains biocollecteurs (cyclones) disposent d'un réservoir et ainsi peuvent injecter la solution de collecte durant le prélèvement augmentant le temps de collecte.

Le temps de collecte pour les techniques de filtrations est dépendant du colmatage des filtres. La filtration est privilégiée pour la collecte des spores fongiques et des endospores qui sont des formes de résistances à la dessiccation. La filtration est conseillée pour des environnements chargés en aérosols sur des temps courts pour pouvoir étudier la fraction viable (Palmgren et al., 1986).

Donc le choix d'un biocollecteur est variable selon que l'on étudie les bioaérosols par voie culturale ou par voie moléculaire. Très souvent les impacteurs en milieu gélosé sont employés avec des méthodes culturales. Par contre, la filtration et la collecte en milieu liquide sont préférentiellement couplées avec une analyse moléculaire du fait des volumes de collecte plus important.

4.2 La caractérisation des bioaérosols

Cette section présente les différentes techniques disponibles afin d'étudier les bioaérosols et ceci pour :

- identifier les micro-organismes présents
- quantifier un groupe de micro-organismes ou des composés biologiques

Le tableau 4.3 répertorie les principales techniques employées pour analyser les bioaérosols. Les différentes techniques présentées sont référencées selon les quatre voies méthodologiques qui sont : la voie chimique, la voie culturale, la voie microscopique et la voie moléculaire.

TABLEAU 4.3: Les différentes techniques employées pour analyser les bioaérosols

Cible	Méthode	Application
Molécules		
Endotoxines	LAL colorimétrie	Quantification
Glucanes	Chimique	Quantification
ATP	Dosage	Quantification
ADN	Dosage	Quantification
	Microscopie	Quantification
	Comptage direct	Quantification
	Epifluorescence :	
	DAPI-Acridine Orange...	Quantification
	Live-Dead	Quantification
	FISH	Identification
		Quantification
		Localisation
		Identification
	Séquençage	Identification
	DGGE	Identification
	Puces à ADN	Quantification-Identification
	PCR quantitative	Quantification-Identification
	Empreintes moléculaires	Structure de la communauté
Micro-organismes		
Bactéries	Chimique	Quantification – Identification
Champignons	Dosage des marqueurs	
	Bactéries Gram + et - :	
	Acide muranique	

Cible	Méthode	Application
	<p>Bactéries Gram négatif : AG-3OH (10-14 carbones) 16 :1ω7t, 16 :1ω5, cy17 :0, 18 :1ω7 cy19 :0, 16 :1ω5</p> <p>Bactéries Gram positif : i15 :0, a15 :0, i16 :0, i17 :0, a17 :0, 10Me17 :0</p> <p>Actinobactéries : AG-3OH (>16 carbones) 10Me18 :0</p> <p><i>Mycobacterium sp.</i> 2-Ecosanol Acide gras ramifiés</p>	
	<p>Champignons Ergostérol 18 :2ω6,9</p>	
Micro-organismes	Bactéries	Dénombrement
	Champignons	Identification
	Culturale	Identification

Cible	Méthode	Application
	Bactéries	
	Milieux liquides (NPP) ¹	Dénombrement
	Galerie identification	Identification
Microscopie	Comptage direct	Quantification
	Morphologie	Identification
	Epifluorescence :	
	DAPI-Acridine Orange...	Quantification
	Live-Dead	Quantification
	FISH	Identification
		Quantification
		Localisation
Micro-organismes	Séquençage	Identification
	DGGE	Identification
Bactéries	Puces à ADN	Quantification – Identification
	PCR quantitative	Quantification – Identification
Champignons	Empreintes moléculaires	Structure de la communauté

¹ Nombre le plus probable

4.2.1 Les méthodes chimiques

4.2.1.1 Détection des micro-organismes

Il est possible de détecter les micro-organismes par la voie chimique, elle repose sur le dosage de composés qui peuvent être plus ou moins spécifiques à certains micro-organismes. Les différents composés présentés ci-dessous sont stables dans le temps.

4.2.1.1.1 L'adénosine triphosphate

La méthode de dosage de l'Adénosine triphosphate (ATP) est enzymatique et repose sur les propriétés de bioluminescence de la luciférine. L'émission de photons est provoquée par l'oxydation de l'ATP par la luciférase. La réaction consomme une molécule d'ATP par photon émis, ce qui rend cette méthode quantitative et sensible.

Une concentration théorique en ATP pour les bactéries est de 3×10^{-6} pmol et de 3×10^{-5} pmol par spore pour les champignons (Amato et al., 2007).

4.2.1.1.2 L'acide muramique

L'acide muramique entre dans la composition du peptidoglycane, composant de la paroi des bactéries. La quantité d'acide muramique dans la cellule est variable selon le type de paroi (bactérie Gram négatif : $12 \mu\text{g mg}^{-1}$, bactérie Gram positif : $44 \mu\text{g mg}^{-1}$) (Moriarty, 1977). Ce marqueur permet de doser les bactéries (Gram positif et négatif) par chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC ("High Performance Liquid Chromatography") ou par chromatographie gazeuse (Gora et al., 2009).

4.2.1.1.3 L'ergostérol

C'est un lipide appartenant aux stéroïdes. Il est présent au sein de la membrane plasmidique des champignons, des spores fongiques ainsi que dans les levures. Le rôle supposé de l'ergostérol est une fluidité de la membrane. Il est utilisé comme marqueur de la biomasse fongique.

La limite de quantification est de $0,4 \text{ ng m}^{-3}$ soit une valeur théorique de 150 spores par m^{-3} (Robine et al., 2006).

4.2.1.1.4 Les glucanes

Les glucanes sont des constituants des spores fongiques mais sont également présents dans les végétaux. Les 1-3- β -D-glucanes peuvent être dosés par la même méthode que celle employée pour le dosage des endotoxines ou par un test immunochimique (CSHPF, 2006).

4.2.1.1.5 Les polysaccharides extracellulaires

Ces polymères sont excrétés et peuvent être détectés par des méthodes immunochimiques (ELISA). C'est une méthode rapide mais spécifique uniquement du genre fongique (CSHPF, 2006).

4.2.1.1.6 Les mycotoxines

Certaines mycotoxines (la stérigmatocystine, la déoxynivalénol, l'ochratoxine A et les trichothécènes) sont dosées par HPLC ou chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse (Brasel et al., 2005; Moularat and Robine, 2006). La méthode employée classiquement consiste à rechercher et à identifier les souches toxigènes, sachant que la production de toxines par ces souches n'est pas systématique.

4.2.1.2 Détection des endotoxines

Les endotoxines sont présentes sur la paroi externe des bactéries Gram négatif. Elles sont constituées d'un lipide A, présent dans la membrane et d'une fraction polysaccharidique présente dans la membrane et également en contact avec le milieu extérieur. La libération s'opère lors de division et de la lyse des bactéries. Elles sont composées d'un lipide A et de polysaccharides, figure 4.6 (INRS, 2010).

Le lipide A est constitué de sucre et d'acides gras hydroxylés. La nature des sucres ainsi que le nombre d'acides gras sont variables selon les espèces bactériennes. Les molécules de lipide A sont différentes selon les espèces et également à l'intérieur d'une même famille. Ce lipide, dans son intégralité, est responsable du pouvoir toxique de l'endotoxine. Le lipide A est la portion toxique déterminante (Greff-Mirguet, 2002).

La fraction polysaccharidique est constituée de différents sucres. La nature ainsi que le type de liaison formant la chaîne O spécifique est variable selon l'espèce bactérienne. Elle est constituée de maillons répétitifs (10 chez les salmonelles) contenant chacun entre 3 à 8 sucres (Greff-Mirguet, 2002; INRS, 2010).

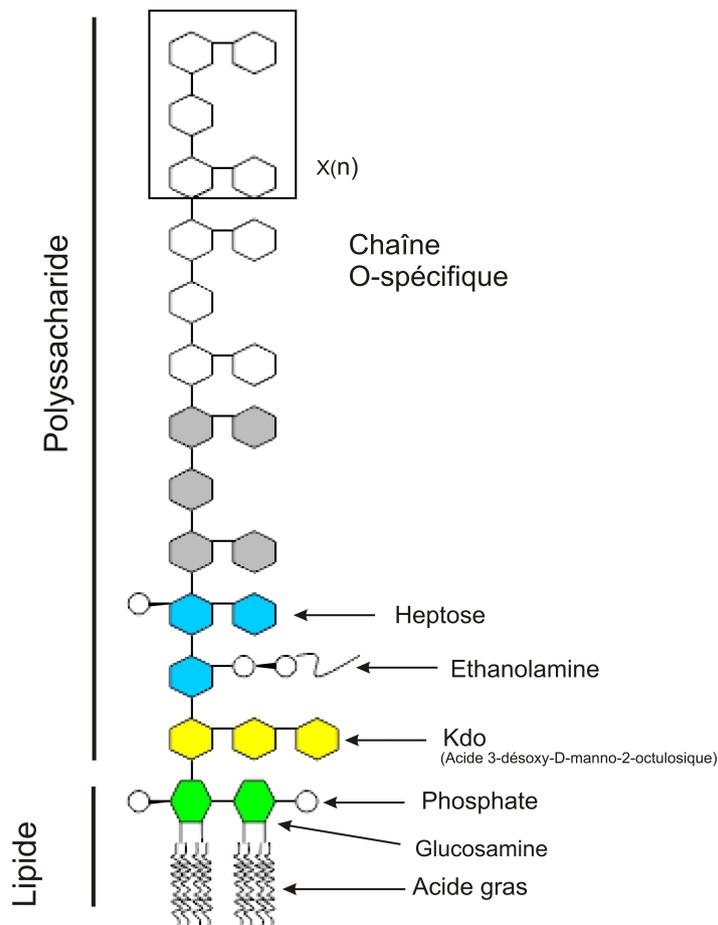


FIGURE 4.6 – Composition d'une endotoxine (INRS, 2010)

Le dosage des endotoxines est réalisé par la méthode LAL (Limulus amœbocyte lysate). C'est une méthode très sensible basée sur l'activation d'une enzyme de coagulation présente dans l'hémolymphe du limule. Ceci permet de détecter une activité endotoxique, les résultats sont exprimés en unité endotoxines (UE). Les résultats sont comparés à un standard (obtenue à partir d'*Escherichia coli*). 10 UE correspondent à 1 ng d'endotoxines. La comparaison entre les résultats est difficile en raison des différentes méthodes d'extraction employées (Jensen et al., 1994).

La limite de détection de cette méthode est de $0,005 \text{ UE mL}^{-1}$.

4.2.1.3 Détection par PLFA

L'acronyme de PLFA signifie acides gras phospholipidiques (PhosphoLipid Fatty Acid). Les phospholipides sont des composants essentiels des membranes (30 à 40% de la membrane). Ils apparaissent être de bons marqueurs de la biomasse et de la diversité des organismes (Lechevalier, 1989). L'extraction est basée sur la méthode de Bligh et Dyer (Bligh and Dyer, 1959).

Il est possible de détecter plusieurs groupes microbiens car la composition de certains acides gras dans la membrane est différente. En effet, les différents acides gras permettant une affiliation sont (Klamer and Baath, 1998) (a : anteiso, i : iso, cy : cyclopropane, Me :

groupement méthylé) :

- Bactéries Gram négatif : 16 :1 ω 7t, 16 :1 ω 5, cy17 :0, 18 :1 ω 7 et cy19 :0 16 :1 ω 5
- Bactéries Gram positif : i15 :0, a15 :0, i16 :0, i17 :0, a17 :0 et 10Me17 :0
- Actinomycètes : 10Me18 :0
- Champignons : 18 :2 ω 6,9

L'analyse des PLFA semble être une méthode fiable pour la détection de rapides changements dans les communautés microbiennes (Pilon, 2006). Cette technique est peu utilisée actuellement du fait de l'avènement des techniques moléculaires basées sur l'ADNr 16S et de l'ADNr 18S, permettant une analyse plus fine des structures des communautés microbiennes.

4.2.2 Les méthodes culturelles

Durant de nombreuses années, la microbiologie était basée sur les techniques culturelles, principalement sur l'enrichissement des micro-organismes, puis sur leur isolement. L'enrichissement favorise leur développement selon les conditions physico-chimiques et nutritionnelles du milieu. En intervenant sur la composition d'un milieu on peut lui donner un caractère plus ou moins sélectif.

Il existe de nombreux milieux de cultures pour les micro-organismes, plus ou moins sélectifs pour permettre leur identification. Le tableau 4.4 présente les principaux milieux de culture utilisés.

TABLEAU 4.4 – Différents milieux de culture pour les micro-organismes

Cible	Milieux de cultures
Bactéries totales	Agar tryptone de soja (TSA) Agar peptone de soja caséine (CSPA) Agar + substance nutritive R2A
Bactéries mésophiles	TSA
Bactéries Gram négatif	Agar sang de mouton MacConkey
Entérobactéries	Drigalski Chapman
Actinomycètes	Agar Difco Agar Littman ox-gall
Actinomycètes thermophiles	CSPA Agar levure glucose tryptone (SMA)
Champignons	Agar extrait de malt (MEA) Agar dichlorane glycérol (DG-18) Agar rose de Bengale (RBA)

Les milieux les plus employés sont le milieu TSA pour les bactéries et le milieu MEA pour les champignons (Lacey, 1991). Les températures d'incubation vont de 28°C à 35°C pendant 1 à 7 jours pouvant aller jusqu'à 14 jours pour les champignons. Une température d'incubation de 55°C est utilisée pour les actinomycètes thermophiles. Les résultats sont exprimés en unité formant colonies (UFC).

Il existe également la culture des micro-organismes en milieu liquide qui s'effectue selon une série de dilutions. Le dénombrement est effectué selon le nombre le plus probable (NPP).

4.2.3 Les méthodes microscopiques

La microscopie fut inventée au cours du 17^{ème} siècle par Antoine Van Leeuwenhoek. L'observation microscopique donne peu d'informations sur l'identification de la plupart des micro-organismes sauf pour les champignons.

4.2.3.1 Comptage direct

Le comptage est réalisé à l'aide d'un microscope photonique. Le dénombrement des cellules s'effectue sur des cellules de Mallassez, de Thoma . . . dans un volume de liquide défini. Cette technique n'est applicable que pour les cellules qui ne sont pas agrégées. L'observation peut être couplée à un système d'images permettant également de dénombrer.

4.2.3.2 Comptage par épifluorescence

Le dispositif repose sur l'observation de l'excitation d'un fluorophore par une source de rayons ultraviolets. Les différents marqueurs utilisés sont le DAPI (6-diamidino-2-phénylindole), l'acridine orange, le bromure d'éthidium, l'iodure de propidium . . . Par l'exemple le DAPI qui se fixe à l'ADN et fluorescent sous les UV.

Certains fluorophores ont des propriétés comme l'iodure de propidium qui se fixe sur l'ADN dont les cellules ont perdu l'intégrité membranaire. A partir des différentes propriétés des fluorophores, des systèmes comme le "Live-Dead" ont été développés. Ce test est basé sur l'intégrité membranaire des cellules. Un fluorophore, le Syto 9, pénètre dans toutes les cellules mortes ou vivantes et les colore en vert tandis que le second fluorophore, l'iodure de propidium ne pénètre pas les cellules dont les membranes sont intactes et colore les autres cellules en rouge (Sahu et al., 2005).

La technique FISH pour "Fluorescent in situ hybridization" est l'emploi de sonde marquée possédant un fluorophore. Les sondes sont des séquences complémentaires de la séquence cible. Elles sont marquées par des fluorophores (fluoresceine, rhodamine . . .) (Amann et al., 1990; Corre, 2000). La visualisation de l'hybridation de la sonde sur la séquence cible de l'ARN se fait par microscopie à épifluorescence. Il est possible d'utiliser différents types de sondes du plus généraliste (bactérie, eucaryote) au plus spécifique (genre).

Une autre méthode permet de compter les cellules viables par l'ajout d'inhibiteur du doublement cellulaire (l'acide nalidixique). Les cellules ne peuvent plus se développer, mais deviennent "géantes" (figure 2.2) (Kogure et al., 1978).

4.2.3.3 La microscopie électronique

La microscopie électronique à balayage (MEB) utilise un faisceau d'électrons dirigé sur l'échantillon permettant un très fort grossissement jusqu'à 3×10^5 . Le MEB permet d'observer en trois dimensions les micro-organismes ainsi que leur structure. Cette technique a été employée pour étudier les spores fongiques et d'actinomycètes prélevées par filtration (Eduard, 1993).

4.2.4 La cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique analytique qui permet d'analyser un grand nombre de cellules contenues dans un fluide à grande vitesse devant un faisceau d'un laser. Ceci permet de compter et de caractériser chacune des cellules. C'est la lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) qui permet de classer les cellules selon différents critères et de les trier.

Il est possible par différents signaux optiques de mesurer divers paramètres de la cellule (tableau 4.5).

TABLEAU 4.5 – Paramètres mesurés en cytométrie en flux (<http://cyto-base.monp.inserm.fr>)

Signaux optiques	Paramètres mesurés	Utilisation
Diffusion à petit angle	taille cellulaire	morphologie des cellules
Diffusion à angle droit	réfringence cellulaire	morphologie
Fluorescence	ADN	marqueurs cellulaires,
	flux ioniques	fonctions cellulaires
	potentiel transmembranaire	

4.2.5 Les méthodes moléculaires

L'émergence des techniques moléculaires est due principalement au développement de la phylogénie moléculaire à la fin des années soixante (Zuckerland and Pauling, 1965).

L'extraction des acides nucléiques provenant des micro-organismes aérosolisés peut être réalisée par différentes techniques d'extraction de l'ADN. De manière générale, elles combinent des méthodes de lyse thermique, de lyse chimique, de lyse physique (broyage) et une lyse enzymatique (lysozyme, RNAses . . .) (Radosevich et al., 2002; Williams et al., 2001). Une fois l'extraction d'ADN réalisée, il est nécessaire d'effectuer une étape de purification afin de séparer l'ADN des autres composés apparus durant l'extraction (acides humiques. . .) qui seraient susceptibles d'avoir un effet d'inhibition lors des réactions moléculaires à venir.

4.2.5.1 Amplification de l'ADN

L'amplification de l'ADN s'effectue par la PCR ("Polymerase chain reaction") grâce à une ADN polymérase. Cette méthode a été mise au point par (Mullis, 1987). La PCR est une technique d'amplification d'une séquence d'ADN ciblée. En effet il est nécessaire d'avoir un couple d'amorces afin d'amplifier une zone cible. L'intérêt est qu'à partir d'un

échantillon complexe et peu abondant en ADN, une importante quantité d'un fragment ADN est amplifié de l'ordre de 2^{n+1} (n : nombre de cycles).

Une amplification est réalisée en trois étapes : la dénaturation qui sépare l'ADN double brin en simple brin, ensuite vient l'étape d'hybridation qui consiste à la fixation des amorces sur l'ADN et enfin l'élongation réalisée par l'ADN polymérase à partir des amorces. Ce cycle est reproduit généralement 20 à 30 fois.

4.2.5.2 L'ADN ribosomique

Les micro-organismes possèdent trois ADN ribosomiques qui sont classés selon leur coefficient de sédimentation :

- Pour les bactéries et les archées, la grande sous unité du ribosome (50S) est composée de l'ARNr 5S qui compte environ 120 nucléotides, l'ARNr 23S qui présente environ 3000 nucléotides et la petite sous unité comporte l'ARNr 16S qui est composé d'environ 1500 nucléotides.
- Pour les eucaryotes, la grande sous-unité du ribosome (60S) est composée de l'ARNr 28S (4800 nucléotides), de l'ARNr 5,8S (160 nucléotides) et de l'ARNr 5S (120 nucléotides). Tandis que la petite sous-unité (40S) est composée de l'ARNr 18S (1900 nucléotides).

L'ADN ribosomique 16S pour les bactéries et 18S pour les eucaryotes ont été choisis comme marqueur phylogénétique pour plusieurs raisons :

- Il est présent dans tous les micro-organismes et possède la même fonction
- Sa séquence présente des régions conservées et des régions variables. Ceci permet de comparer des espèces éloignées ainsi que des espèces proches (figure 4.7).
- Il évolue lentement au cours du temps
- Il est facilement extractible du fait de l'abondance dans les cellules (en moyenne 2 copies pour les bactéries)
- Il est préféré au 5S et au 23 S du fait de sa taille et de sa structure secondaire moins marquées.

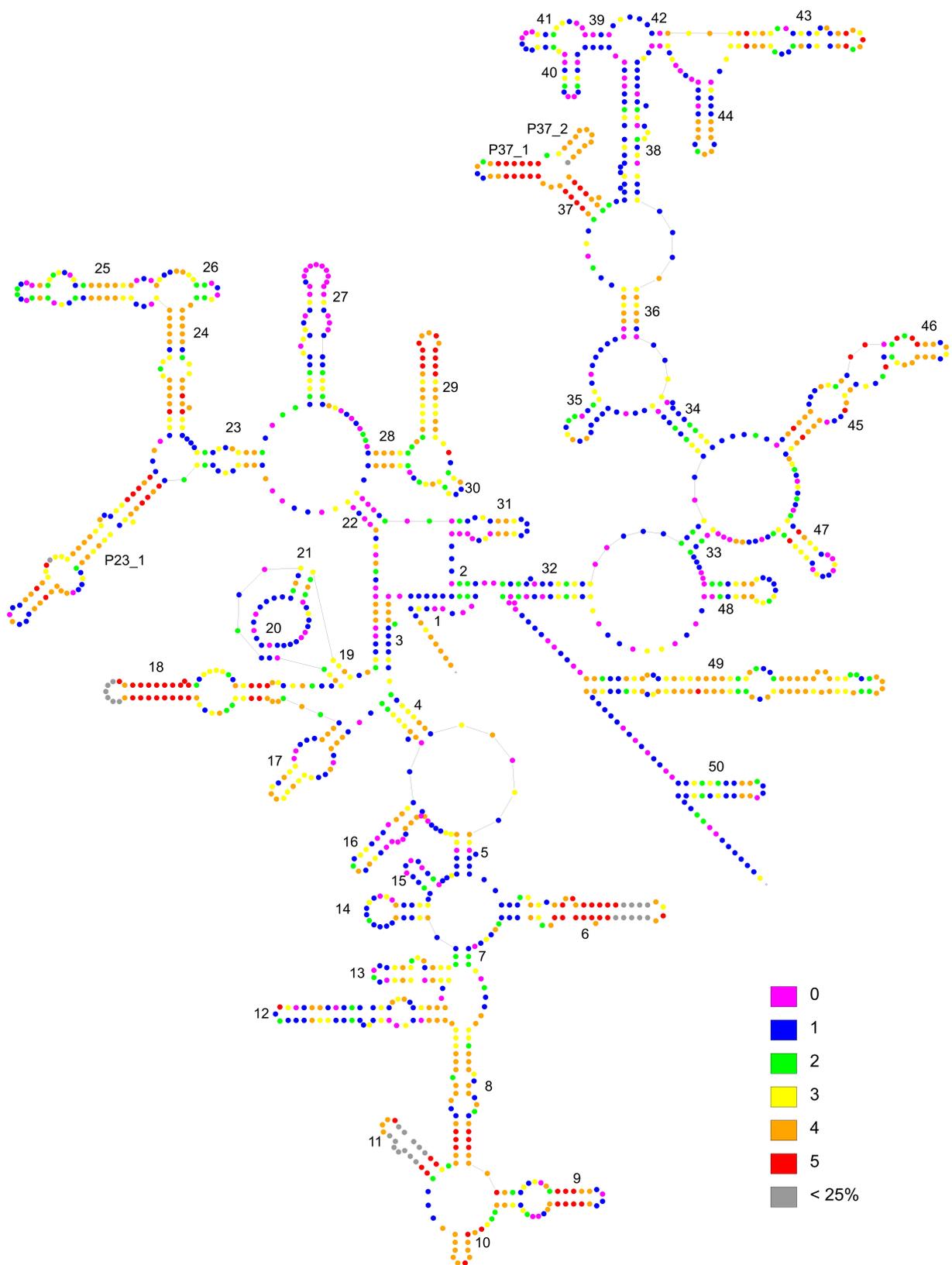


FIGURE 4.7 – Zones conservées et zones variables au sein de l'ADNr 16S. La variabilité de chaque base est indiquée par le code couleur (Van de Peer et al., 1996)

Après l'extraction puis l'amplification de l'ADNr 16S ou 18S, il est possible d'effectuer des études sur la communauté.

4.2.5.3 Les études des communautés

4.2.5.3.1 Le clonage-séquençage

La technique de clonage-séquençage est largement utilisée en écologie microbienne. Les ADNr 16S ou 18S amplifiés sont purifiés pour pouvoir être ensuite clonés. Le clonage est réalisé en deux étapes, tout d'abord la phase de ligation qui correspond à l'insertion du produit de PCR au sein du plasmide. La seconde phase consiste à insérer le vecteur dans une cellule d'*Escherichia coli*. Les cellules sont mises à incuber en présence d'antibiotique afin de s'assurer que seules les cellules dont le vecteur contient une séquence se développent du fait de la présence d'un gène tueur sur le plasmide. Le passage par l'insertion des produits de PCR dans les cellules compétentes permet de sélectionner les clones qui vont être séquencés.

Le séquençage consiste à déterminer l'ordre d'enchainements des nucléotides. Il est réalisé par la méthode Sanger qui maintenant va être remplacée par une nouvelle technique : le pyroséquençage. La méthode Sanger a été inventée dans les années 1970. Elle est basée sur l'interruption de la synthèse enzymatique d'un brin d'ADN. Une amorce est ajoutée ainsi que les dNTPs et des ddNTPs (didésoxynucléotides) marqués. Ces ddNTPs entraînent l'arrêt de la synthèse du brin d'ADN. La longueur des fragments générés est aléatoire. Pour un séquençage complet d'un fragment d'ADN, il faut répéter quatre fois la réaction en parallèle, avec les quatre ddNTPs différents. Cette technique a été automatisée, les quatre ddNTPs portent chacun un fluorophore différent (figure 4.8).

L'avantage du pyroséquençage, l'étape de clonage n'est plus obligatoire. Son principe repose sur le fait que les nucléotides sont insérés les uns après les autres. Si le dNTP ajouté correspond à celui attendu, il est hybridé et libère un pyrophosphate. L'ATP sulfurylase transforme ce pyrophosphate en ATP qui est ensuite couplé à une luciférase produisant un signal lumineux. L'apyrase dégrade les nucléotides en surplus. Le signal lumineux est converti en pic d'intensité par nucléotides incorporés, ainsi on peut déduire la séquence selon l'intensité des pics (figure 4.8).

Après le séquençage, un travail de nettoyage (suppression des amorces, des séquences chimériques...) est réalisé. Si l'inventaire est important, il est nécessaire de réduire le nombre de séquences avant d'interroger les bases de données. Pour ce faire, des logiciels de bioinformatique existent et classent les séquences en différents phylotypes. Il est défini en biologie moléculaire comme correspondant à une "espèce moléculaire". Des séquences présentant un pourcentage de similarité $\geq 97\%$ appartiennent au même phylotype. Les bases de données (GenBank, EMBL) permettent de comparer les séquences obtenues par rapport à celles qui y sont présentes (106×10^9 bases et 108×10^8 séquences en 2009) afin de pouvoir les affilier. La comparaison est réalisée par un algorithme BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool") (Altschul et al., 1990). Une autre base existe, elle est présente

sur le site de RDP (“Ribosomal Database project”, (<http://rpd.cme.msu.edu/>)). Cette base contrairement à GenBank contient uniquement des séquences issues de l’ADNr 16S ($1,4 \times 10^6$ séquences en 2010). De plus il y a peu de clones environnementaux présents dans cette base.

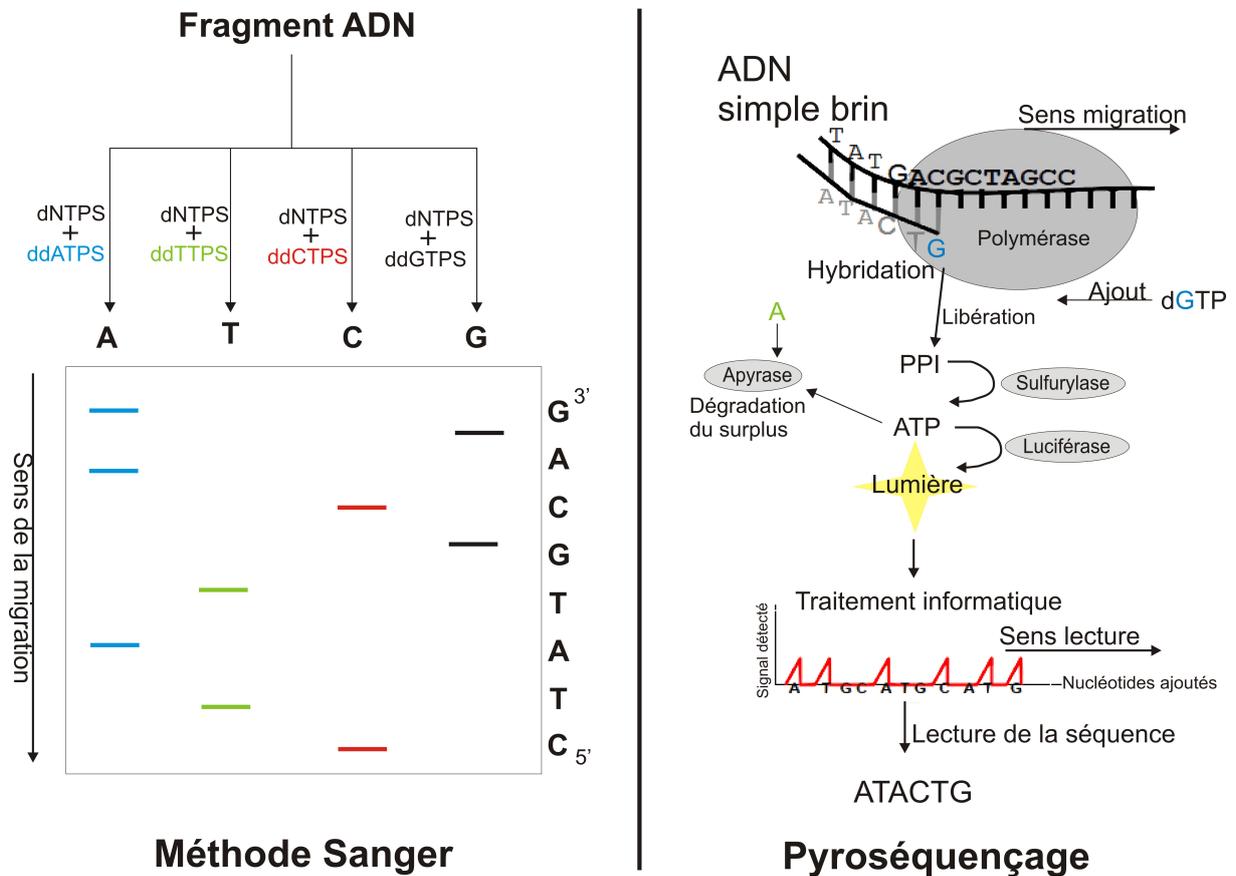


FIGURE 4.8 – Principe du séquençage selon la méthode Sanger et selon le pyroséquençage

4.2.5.3.2 Les empreintes moléculaires

a) L’ARDRA – RFLP

L’ARDRA signifie analyse de restriction d’ADN ribosomaux amplifiés. Il s’agit d’une RFLP (analyse des longueurs des fragments de restriction) appliquée à l’ADN ribosomal.

Après amplification de l’ADNr 16S d’un échantillon, une digestion enzymatique est réalisée par des enzymes de restriction (choisis pour leur fréquence de coupure). Les fragments obtenus sont analysés par un séquenceur ou par migration électrophorétique ce qui donne une empreinte de la communauté bactérienne présente dans l’échantillon.

b) La DGGE

La technique d’électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) permet de discriminer des fragments d’ADN de taille identique ou quasi-identique. La séparation est basée sur les changements de mobilité électrophorétique des fragments amplifiés migrant

dans un gel vertical de polyacrylamide et contenant un gradient dénaturant de formamide et/ou urée.

Lorsque les fragments d'ADN migrent au sein de ce gel d'électrophorèse, une fusion partielle du double brin d'ADN se produit dans des régions discrètes de celui-ci, retardant sa migration. Pour éviter la dénaturation totale du double brin, une structure à très haute température de fusion (le "GC clamp" comportant une succession de 40 GC) est associée à l'ADN lors de l'amplification. Les variations de séquences dans les zones à faible température de fusion font que des séquences différentes stopperont leur migrations dans des zones différentes du gradient dénaturant (Theron and Cloete, 2000).

Des variantes de la DGGE, différant par leur type de gradient, existent également :

- La TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis). Dans cette technique, la séparation des fragments d'ADN se fait grâce à un gradient de température (Muyzer, 1999).
- La TTGE (Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis). En TTGE, la migration des fragments d'ADN se fait dans un gel possédant une concentration uniforme d'un agent dénaturant et la température augmente graduellement durant la migration (Farnleitner et al., 2000; Ogier et al., 2002).

c) La SSCP

La technique d'analyse de polymorphisme de conformation d'acides nucléiques simple brin (SSCP : "Single strand conformation polymorphism") développée pour détecter des mutations dans les gènes humains est aujourd'hui utilisée en écologie microbienne (Hayashi, 2002; Godon et al., 2001; Godon and Zumstein, 1997; Schwieger and Tebbe, 1998; Zumstein et al., 2000). Cette technique est basée sur la migration selon la structure secondaire des ADN ribosomaux.

Après extraction de l'ADN génomique et amplification par PCR d'une zone variable de l'ADNr 16S (principalement la région V3, des bactéries et de la région V7 de l'ADNr 18S pour les eucaryotes). Les fragments amplifiés sont ensuite dénaturés en ADN simple brin (dénaturation thermique) et sont brutalement refroidis afin d'obtenir la conformation secondaire des ADN simple brin. Les ADN simple brin vont faire l'objet d'une migration électrophorétique qui peut être réalisée soit sur gel de polyacrylamide non dénaturant soit par capillarité à l'aide d'un séquenceur automatique.

Dans ce dernier cas, le fragment est marqué par l'utilisation d'un fluorophore sur l'une des deux amorces utilisées lors de l'amplification. Dans des conditions non-dénaturantes, la structure secondaire de l'ADN simple brin est affectée par des interactions intramoléculaires. La mobilité électrophorétique des ADN simple brin se fera donc en fonction de leur masse moléculaire et de leur structure secondaire (figure 4.9). Par une migration électrophorétique, on obtient un profil de la communauté microbienne, où chaque pic correspond à un phylotype. Il est possible de comparer les profils et ainsi d'observer des similarités ou non au sein des échantillons.

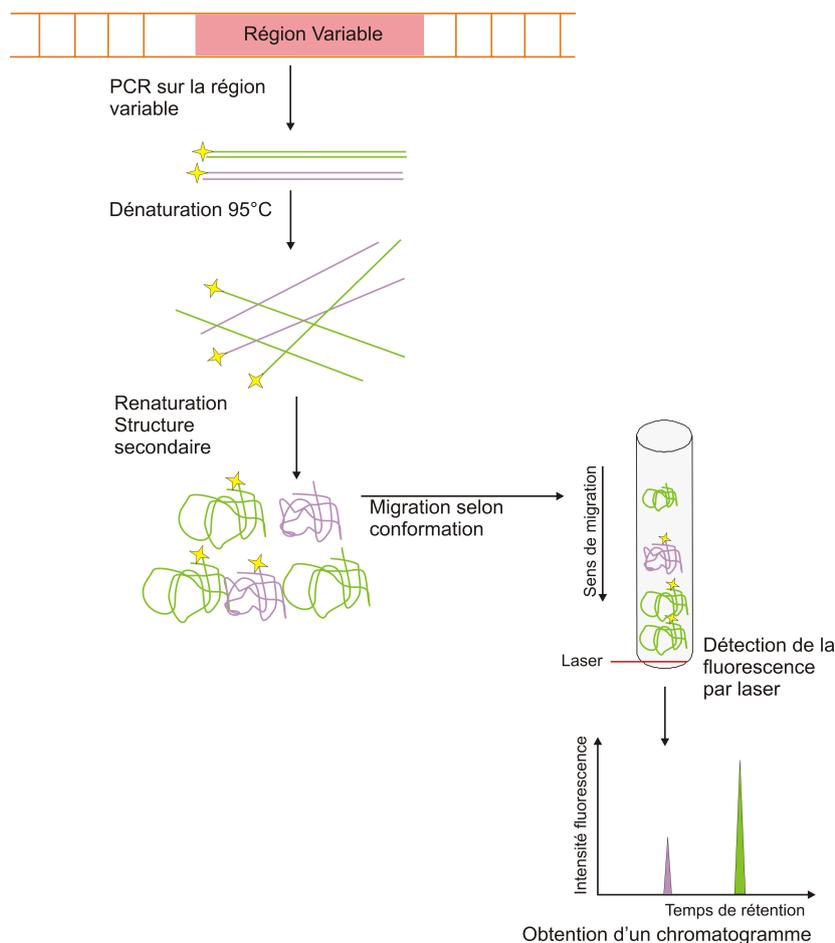


FIGURE 4.9 – Principe de la SSCP

d) L'ARISA

L'ARISA signifie "Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis", c'est l'analyse automatisée de l'espace intergénique de l'ADN ribosomal mise au point par Fisher et Triplett en 1999 (Fisher and Triplett, 1999). L'espace intergénique (ITS) est amplifié par PCR en présence d'une amorce marquée d'un fluorophore. La séparation des amplicons est réalisée soit sur gel non dénaturant soit par une électrophorèse capillaire. Lors d'une électrophorèse capillaire, les pics de fluorescence sont détectés, permettant la constitution d'un profil. Elle permet d'étudier la dynamique des communautés tout comme la SSCP.

4.2.5.4 La quantification

4.2.5.4.1 La PCR quantitative

Il s'agit d'une technique permettant de suivre la réaction d'amplification au fur et à mesure qu'elle s'effectue par l'intermédiaire d'un fluorophore dans le but de quantifier la séquence cible dans l'échantillon. Durant la phase exponentielle, le nombre de molécules amplifiées est proportionnel au nombre de molécules cibles présentes dans la matrice. Deux techniques de détection en PCR quantitative peuvent être utilisées.

Dans une première technique, le marquage de l'ADN est réalisé grâce à un intercalant. Le SYBR Green I est une molécule qui s'intercale uniquement dans l'ADN double brin.

Cette molécule est un fluorophore qui émet une fluorescence uniquement lorsqu'elle est liée à l'ADN et non pas sous sa forme libre. A chaque cycle de PCR lors de la phase d'élongation, cette molécule s'intercale entre les nouveaux brins formés. La fluorescence augmente proportionnellement au nombre de copies. Elle est liée à la quantité initiale et au nombre de cycles de PCR (figure 4.10).

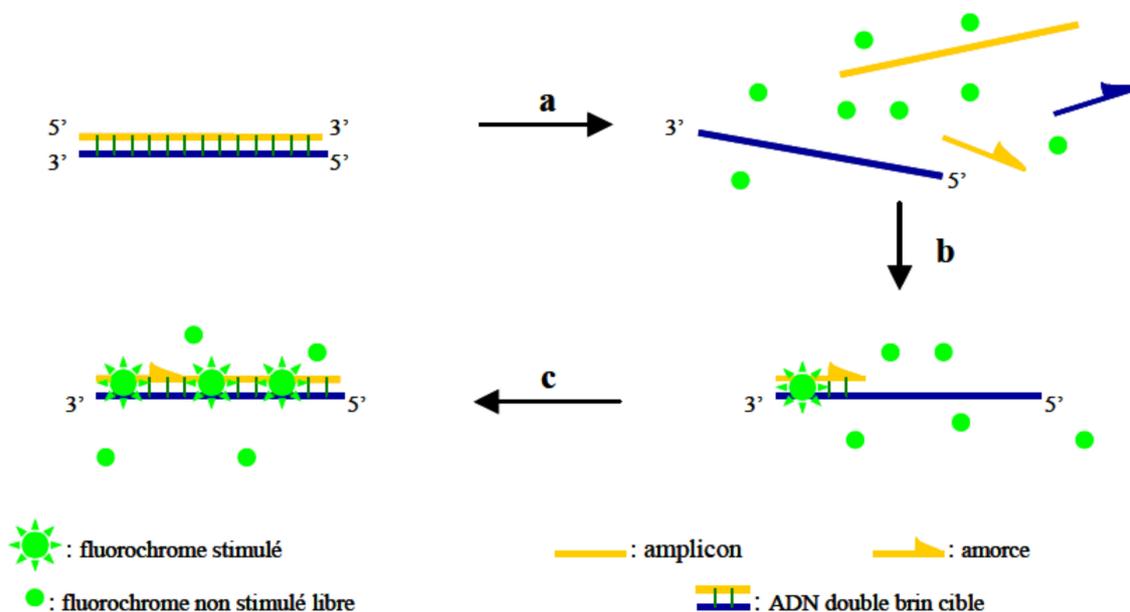


FIGURE 4.10 – Principe de la PCR quantitative avec le SYBR Green

La seconde technique de détection est basée sur l'utilisation d'une sonde marquée avec un fluorophore. L'utilisation de sonde a permis d'améliorer la spécificité de détection des amplicons. La sonde est un oligonucléotide d'une longueur généralement comprise entre 20 et 30 bases. Un fluorophore (Reporter) est fixé en 5' tandis qu'un extincteur (Quencher) est présent en 3'. Le système de quantification est donc composé d'une amorce sens, d'une amorce anti-sens et d'une sonde.

La méthode de PCR quantitative repose sur l'utilisation de l'activité exonucléasique 5'-3' de la Taq polymérase, permettant de cliver une sonde durant la PCR (Lie and Petropoulos, 1998).

Durant la réaction, en présence de la cible, la sonde s'hybride de façon spécifique ainsi que les deux amorces. Lorsque la sonde est intacte, le "quencher" empêche la fluorescence. Elle ne sera émise que lorsque l'activité exonucléasique 5'-3' de la Taq polymérase dégradera la sonde libérant ainsi le "reporter", entraînant une accumulation de la fluorescence au fur et à mesure de l'amplification (figure 4.11).

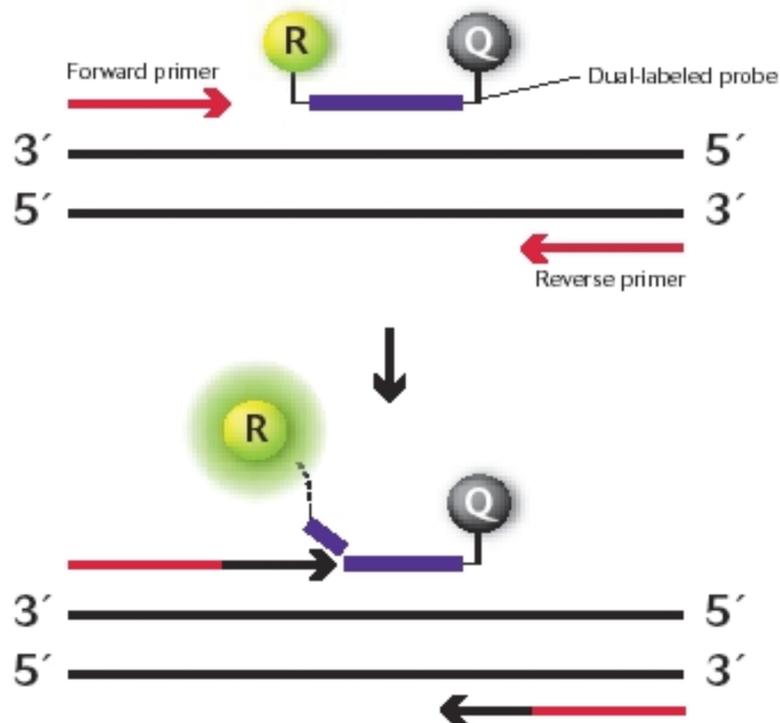


FIGURE 4.11 – Principe de la PCR quantitative avec le système TaqMan

En PCR quantitative, les deux principaux systèmes de quantification employés sont ceux utilisant le marqueur au SybrGreen et le système TaqMan. Ils existent d'autres systèmes de quantification reposant sur les sondes comme le FRET (transfert d'énergie entre les molécules fluorescentes), les balises moléculaires et son amélioration, les sondes scorpions.

4.2.5.4.2 Les puces à ADN

Cette technologie est employée en écologie microbienne (Peplies et al., 2003; Taroncher-Oldenburg et al., 2003; Wu et al., 2001). Si la mise en œuvre de la technique est assez compliquée, son principe est relativement simple. Des oligonucléotides ou des fragments d'ADN amplifiés par PCR (dénaturés juste avant l'hybridation pour être sous forme simple brin) sont déposés sur une lame recouverte de polylysine qui permet leur fixation grâce à des interactions électrostatiques. Il existe différentes tailles de puce permettant de déposer entre 2×10^3 et 3×10^5 oligonucléotides. Sur la puce des séquences d'ADN ribosomiaux peuvent être déposées, permettant la recherche de plusieurs espèces ciblées à la fois dans un échantillon. L'ADN extrait d'un échantillon environnemental est mis en contact avec la puce. Ces fragments sont couplés à un fluorophore. L'hybridation sonde – cible sur chaque spot est excitée par un laser et la fluorescence émise est récupérée par un photomultiplicateur (PMT) couplé à un microscope confocal ou à des lecteurs de puces. Des logiciels d'analyses permettent de déterminer l'intensité d'hybridation sur chaque spot. Le principe de cette technique est présenté sur la figure 4.12.

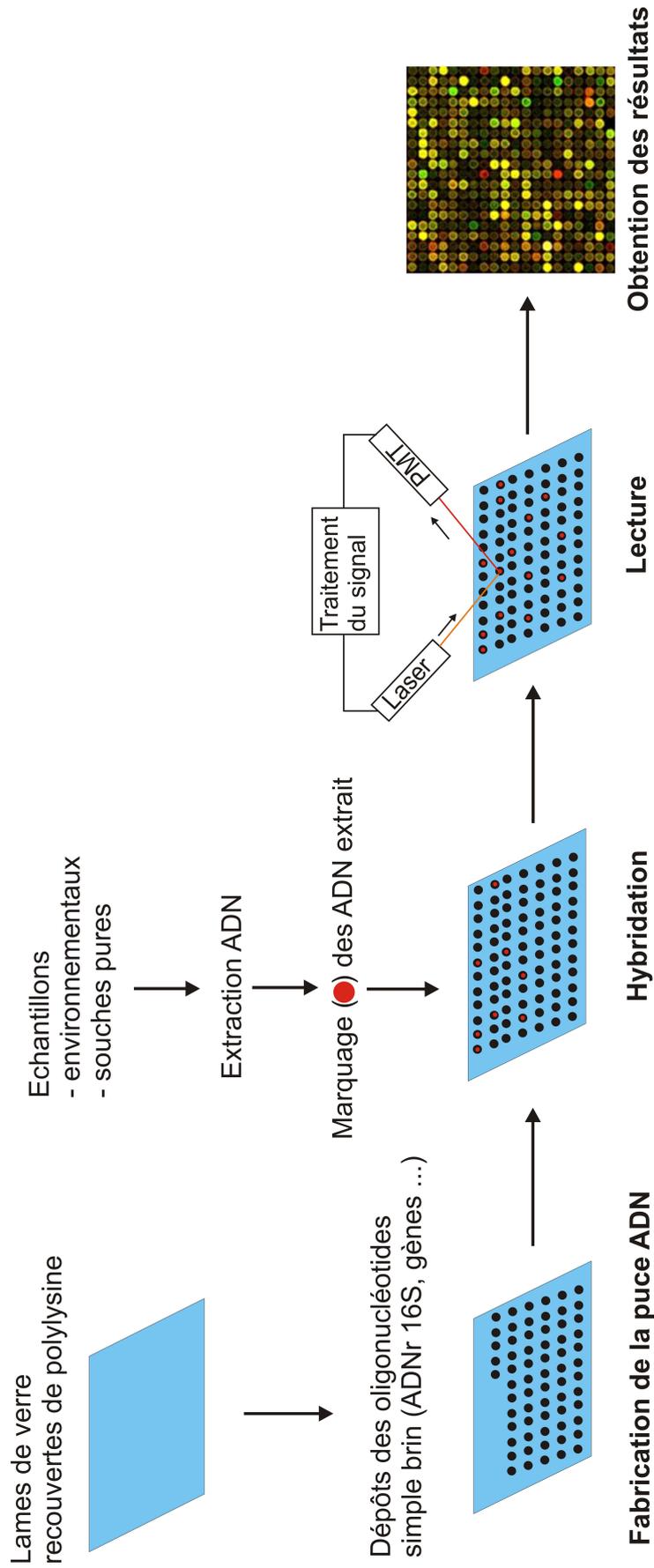


FIGURE 4.12 – Principe d’une puce à ADN (<http://www.transcriptome.ens.fr>)

4.2.6 Avantages et inconvénients des différentes techniques

Les avantages et les inconvénients des différentes techniques présentées précédemment sont recensés dans le tableau 4.6.

TABLEAU 4.6: Avantages et inconvénients des techniques

Technique	Avantages	Inconvénients	Utilisation liée aux bioaérosols
Microscopie	Rapide Observation directe-indirecte Dénombrement totaux, viables, non viables Observation structure Interaction au sein des biofilms	Difficile d'identifier les bactéries et certaines spores de champignons Erreurs comptage si agrégats	(Neef et al., 2003) (Palmgren et al., 1986)
Culturale	Identification d'espèces sur milieux spécifiques Dénombrement (UFC, NPP) Seuil de quantification bas Différents tests métaboliques, activités...	Développement que des micro-organismes cultivables Incubation longue (pour les champignons 14 jours)	(Albrecht et al., 2007) (Grisoli et al., 2009) (Sanchez-Monedero and Stentiford, 2003)
Cytométrie en flux	Rapidité de l'analyse Caractéristique individuelle des cellules Quantitatif Qualitatif (morphologie)	Pas d'étaçons internationaux de référence Problème de comparaison entre les différentes études	(Lange et al., 1997)

Technique	Avantages	Inconvénients	Utilisation liée aux bioaérosols
Cytométrie en flux	Sensible Analyse simultanée de différents paramètres	Interprétation difficile des résultats	
Chimique			
Glucane	LAL : sensible Immunochimique (EIA) reproductible, Spécifique	Peu spécifique Pas commercialisé Peu sensible dans l'air	(Douves and Wouters, 2000) (Chew et al., 2001)
Endotoxines	LAL colorimétrique Sensible reproductible	Comparaison difficile entre les études Différentes méthodes d'extraction	(Douves and Wouters, 2000)
EPS	Immunochimique ELISA Sensible, spécifique Rapide	Pas de valeurs de référence Détection du genre pas de l'espèce Pas commercialisé	(Chew et al., 2001)
Ergostérol	Bonne représentation de la biomasse fongique	Dégradation rapide Teneurs variables selon âge de la culture, l'espèce	(Robine et al., 2006)
Mycotoxines	Chromatographie	Peu employée Certaines mycotoxines	(Brasel et al., 2005) (Moulatrat and Robine, 2006)

Technique	Avantages	Inconvénients	Utilisation
PLFA	Acides gras spécifiques de certains micro-organismes Structures de communauté Détection des viables Quantitative Reproductible	Niveau taxonomique faible/ à l'ADNr (bactéries Gram + /-, actinomycètes, champignons) Composition variable selon la physiologie des micro-organismes Nécessité d'une base de donnée au préalable	(Klamer and Baath, 1998)
Moléculaire			
ARDRA	Restriction enzymatique	Pas quantitatif	
T-RFLP	Profil de communauté Comparaison des profils	Test de plusieurs enzymes pour Obtenir une bonne résolution Restriction incomplète sur-estimation Profils complexes difficiles à interpréter	(Despres et al., 2007)
ARISA	Rapide Reproductible Profil de communauté sur gel : excision des bandes pour séquençage	Une espèce plusieurs pics 85% ITS correspondent à 2-3 pics Electrophorèse capillaire pas d'excision bande	(Maron et al., 2005)

Technique	Avantages	Inconvénients	Utilisation
DGGE	Sur gel : excision des bandes profil de communauté Reproductible	GC-clamp perte d'efficacité de la PCR Co-migration Réalisation du gel (gradient de concentration)	(Chung, 2007) (Maki et al., 2008)
SSCP	Profil de communauté sur gel : excision des bandes Automatisation électrophorèse capillaire Passage de nombreux échantillons par plaque 96-384 puits Reproductible Comparaison des profils	Un phylotype peut être représenté par plusieurs pics Electrophorèse capillaire pas d'excision bande	(Bru-Adan et al., 2009)
Clonage Séquençage	Clonage : conservation des clones à -80°C Rapide séquenceur automatique Identification de l'espèce Métagénomique Direct après PCR (pyroséquençage)	Chimère Autres biais	(Radosevich et al., 2002) (Brodie et al., 2007) (Wilson et al., 2002) (Maron et al., 2005)

Technique	Avantages	Inconvénients	Utilisation
PCR quantitative	Rapide		
SybrGreen	Sensible à la séquence cible Couple d'amorces plus fluorophore Détection lors du doublement de l'ADN	Fluorescence émise aspécifique	(Lee et al., 2010)
TaqMan	Couple d'amorces Plus sonde marquée Très spécifique de la séquence cible	Conception plus ou moins aisée	(McDevitt et al., 2004)
Puces à ADN	Détection de plusieurs espèces en même temps dans un échantillon Différents niveaux d'étude (taille des puces) 2×10^3 à 3×10^5 oligonucléotides par puces	Plusieurs dépôts de cible à différents endroits de la puce pour meilleure lisibilité (formation de comètes)	(Brodie et al., 2007) (Wilson et al., 2002)

L'automatisation des techniques permet une comparaison d'un grand nombre d'échantillons avec une forte reproductibilité et une bonne sensibilité de détection. Mais l'inconvénient majeur de ces technologies automatisées est l'impossibilité de séquencer les pics d'intérêts.

Les techniques culturales nous permettent d'analyser seulement la fraction viable présente dans l'atmosphère qui rappelle le est inférieure à 1%. De plus il est très difficile d'adapter des milieux aux conditions environnementales. Ce qui nous informe d'une vision très partielle de la diversité microbienne aérosolisée contrairement aux méthodes moléculaires (détecte la fraction viable, viable mais non cultivable ainsi que la fraction morte). Souvent sur les boîtes de Pétri, l'échantillon n'est pas assez dilué, ce qui peut entraîner un non dénombrement des colonies formées, si supérieures à 300 UFC. La plage de lecture d'une boîte de Pétri est comprise entre 30 et 300 UFC.

La limite des outils moléculaires réside dans le volume d'air qui doit être collecté. En effet si une faible quantité d'ADN est prélevée, il sera difficile de l'extraire puis de l'amplifier sans risque de contamination de part la formation de chimères durant la PCR. Lors de l'extraction, l'ADN provenant des cellules viables ainsi que des cellules mortes est extraite ce qui entraîne un biais, surestimation, sur la quantification et sur l'image de la structure populationnelle. Des techniques ont été mises au point afin de permettre d'étudier uniquement les cellules viables, par l'emploi de molécules telles que le PMA (propidium monoazide) et EMA (éthidium monoazide). Au moment de l'extraction, ces molécules sont incorporées et se fixent sur l'ADN dont les cellules ne présentent plus d'intégrité membranaire puis par un choc lumineux, les molécules se lient à l'ADN et en même temps les molécules libres sont inhibées (Nocker et al., 2006; Rudi et al., 2005). Le nombre de copies d'ADNr par micro-organisme est variable, en effet il peut varier entre 1 et 14 copies d'ADNr 16S dans le génome bactérien. Tandis que chez les champignons, l'ADNr 18S peut être compris entre 40 et 90 copies chez *Aspergillus fumigatus* (Herrera et al., 2009). Une autre limite est dans la conception de nouvelles amorces et sondes. En effet leur conception est dépendante des séquences déjà présentes dans les bases de données.

Il existe de nombreuses techniques pour étudier les micro-organismes. La complexité de l'échantillon et le but de l'étude détermineront la technique à utiliser. La plupart des études couplent plusieurs méthodes (Amato et al., 2006; Brodie et al., 2007; Maron et al., 2005).

Deuxième partie

Résultats

Signature microbienne des bioaérosols émis
lors de la phase de fermentation

Article 1 : “The microbial signature of aerosols
produced during the thermophilic phase of
composting”

Le compostage est un procédé biologique qui permet la dégradation et la stabilisation de la matière organique dans des conditions aérobies. La diversité microbienne du compost est importante et varie durant le procédé.

Au cours du procédé de compostage, des bioaérosols sont émis dans l’atmosphère. L’aérosolisation des micro-organismes est principalement due à la manipulation des déchets et du compost. En effet, certaines activités, telles que le retournement des andains, le broyage et le criblage représentent différentes sources de bioaérosols sur une plate-forme de compostage. L’augmentation de la concentration en micro-organismes dans l’air des sites industriels peut atteindre plusieurs unités logarithmiques (Sanchez-Monedero et al., 2005).

Les bioaérosols émis sur les plates-formes de compostage peuvent représenter un risque sanitaire, notamment pour les travailleurs (Douwes et al., 2000, Bungler et al., 2007), par la présence de certains champignons, de certaines bactéries (actinomycètes), d’endotoxines et de 1,3 β -glucanes (Douwes et al., 2003). Cependant, l’étude de l’exposition aux bioaérosols de compostage et de leur dispersion à l’extérieur des sites est rendue difficile par l’absence d’indicateurs de leur présence dans l’air.

La première partie de la thèse a pour objectif de rechercher des indicateurs microbiens spécifiques des bioaérosols de compostage, par la recherche de groupes microbiens communs, constituant la signature microbienne des bioaérosols de compostage (“core species”).

Cet article décrit par des inventaires moléculaires réalisés sur l’ADNr 16S et 18S, la structure des communautés bactériennes et fongiques des bioaérosols collectés lors du retournement d’andains en phase de fermentation sur cinq plates-formes de compostage ouvertes traitant différents types de déchets. Les bioaérosols sont comparés entre eux afin de déterminer les micro-organismes communs. Ces derniers représentent la signature microbienne des bioaérosols émis lors de cette activité.

Malgré les différences observées entre les cinq bioaérosols au niveau de la représentativité des phylotypes, il apparait des similitudes. Les phyla dominants au sein des différents bioaérosols sont *Firmicutes* et *Actinobacteria* pour les bactéries et *Ascomycota* pour les champignons. Au sein de ces phyla, certains groupes microbiens sont communs à au moins quatre sites, il s’agit de *Thermomyces*, *Aspergillus* et *Penicillium* pour les champignons, *Geobacillus*, *Planifilum*, les *Thermoactinomycetaceae* pour les *Firmicutes*, *Saccharopolyspora*, *Thermobifida* et *Saccharomonospora* pour les *Actinobacteria*.

La signature microbienne (“core species”) des bioaérosols produits pendant la phase de fermentation du compostage a été déterminée sur cinq plates-formes de compostage. Les dix phylotypes correspondants constituent des indicateurs microbiens potentiels de l’origine “compost” dans l’air qui pourraient être utilisés dans les études de dispersion ou

pour mettre en évidence une exposition à ces bioaérosols.

Annexe A : le tableau regroupant l'ensemble des phylotypes bactériens obtenus tandis que le tableau présenté dans l'article répertorie uniquement les phylotypes ayant une abondance supérieure à 1%.

ORIGINAL ARTICLE

The microbial signature of aerosols produced during the thermophilic phase of compostingO. Le Goff¹, V. Bru-Adan¹, H. Bacheley², J.-J. Godon¹ and N. Wéry¹¹ INRA, UR50, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, Narbonne, France² Veolia Environnement Recherche et Développement, 291 avenue Dreyfous Ducas, Limay, France**Keywords***Actinobacteria*, bacteria, bioaerosol, compost, culture-independent analysis, diversity, fungi.**Correspondence**Nathalie Wéry, INRA, UR50, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, Narbonne F-11100, France.
E-mail : weryn@supagro.inra.fr2009/0230: received 5 February 2009,
revised 27 April 2009 and accepted 18
May 2009

doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04427.x

Abstract**Aims:** The microbial diversity of bioaerosols released during operational activities at composting plants is poorly understood. Identification of bacteria and fungi present in such aerosols is the prerequisite for the definition of microbial indicators that could be used in dispersal and exposure studies.**Methods and Results:** A culture-independent analysis of composting bioaerosols collected at five different industrial open sites during the turning of composting piles in fermentation was performed by building 16S rDNA and 18S rDNA libraries. More than 800 sequences were analysed. Although differences in the phylotypes distribution were observed from one composting site to another, similarities in the structure of microbial diversity were remarkable. The same phyla dominated in the five bioaerosols: *Ascomycota* among fungi, *Firmicutes* and *Actinobacteria* among bacteria. For each phylum, some dominant phylotypes were common to at least four bioaerosols. These common phylotypes belonged to *Thermomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geobacillus*, *Planifilum*, *Thermoactinomyces*, *Saccharopolyspora*, *Thermobifida* and *Saccharomonospora*.**Conclusions:** The microbial signature of aerosols produced during the thermophilic phase of composting was determined. The similarities observed may be explained by the selection of thermophilic and sporulating species.**Significance and Impact of the Study:** Several bacteria and fungi identified in this study may represent potential indicators of composting bioaerosols in air.**Introduction**

Composting is a waste management method based on the biological degradation and stabilization of organic matter under aerobic conditions. It results in a sanitized and stabilized product rich in humic substances that can be beneficially applied to the land (Sykes *et al.* 2007). The degradation of organic matter is carried out by a complex and highly dynamic microflora containing Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as fungi (Ishii *et al.* 2000; Ryckeboer *et al.* 2003; Hansgate *et al.* 2005). Normal operations taking place at composting plants can be the source of nuisance or pollution involving odors, noise, dust, leachate and bioaerosols (Sanchez-Monedero *et al.* 2005). Bioaerosols are composed of inert particles and adsorbed live micro-organisms (algae, bacteria, fungi,

yeasts) as well as microbial components such as mycotoxins, glucans and endotoxins (Fracchia *et al.* 2006; Peccia and Hernandez 2006). Bioaerosols generated at composting plants are released during processes that involve vigorous movement of material: fresh waste delivery, shredding, compost pile turning and compost screening. The release of bioaerosols is especially significant for composting plants operating in the open because their bioaerosols are released directly into the surrounding area without any pretreatment such as biofilters or bioscrubbers (Sanchez-Monedero *et al.* 2005). Open-air windrow systems still remain the predominant composting technology. The emission of bioaerosols from such composting plants considerably increases the concentration of micro-organisms in the air. Shredding of fresh green waste, pile turning and screening of mature compost can lead to an

increase on site by two logarithmic units (Sanchez-Monedero *et al.* 2005).

Bioaerosols released from composting plants are a cause of concern because of their potential impact on the health of workers and the public living in close proximity to such facilities. The biological hazards potentially associated with bioaerosol emission from composting activities include fungi, bacteria, actinomycetes, endotoxin and 1-3 β -glucans (Douwes *et al.* 2003). Effects of exposure to bioaerosols on respiratory health can include aspergillosis in immuno-compromised individuals, organic dust toxic syndrome, extrinsic allergic alveolitis, allergic rhinitis, asthma, upper airway irritation and mucous membrane irritation (Sykes *et al.* 2007). If the association between composting bioaerosol exposure and adverse health effects has been demonstrated for compost workers in a small number of cases (Herr *et al.* 2003; Bünger *et al.* 2007), the situation is not so clear concerning nearby residents. Some studies have found no relationship between respiratory symptoms and place of residence (Cobb *et al.* 1995) or with the concentration of *Aspergillus fumigatus* (Browne *et al.* 2001), while others have shown that residents located within 150-200 m of a composting plant were affected, suffering from irritative respiratory complaints similar to mucous membrane irritation (Herr *et al.* 2003). Therefore, even if it is clear that exposure to some airborne micro-organisms present in composting bioaerosols can lead to human health impacts, the interpretation of air sampling results remains difficult (Marchand *et al.* 1995).

The risk assessments undertaken to date have relied on air dispersion modelling to estimate downwind concentrations of bioaerosols at a distance and to permit comparisons with measured data upwind or at background locations (Taha *et al.* 2006). Bioaerosol concentrations decrease rapidly with distance from their source and it becomes difficult to verify that measurements at a distance related to a specific activity, as opposed to other noncompost sources (Taha *et al.* 2005). Monitoring microbial indicators in the air of a specifically compost origin would help in improving bioaerosols' dispersion analysis and, therefore, risk assessment. Adequate understanding of the microbial diversity of composting bioaerosols is a prerequisite to the definition of microbial indicators useful in monitoring composting bioaerosols. However, the microbial diversity of composting bioaerosols remains poorly understood despite their potentially associated sanitary risks. Most studies have been carried out using culture methods, while only a small fraction of total microbial diversity (less than 1%) can be cultivated in bioaerosols (Peccia and Hernandez 2006). Furthermore, previous studies have quantified global microbial groups (total bacteria, total fungi) (Heida *et al.* 1995; Van

Tongerren *et al.* 1997) or a few specific groups (actinomycetes, *Aspergillus fumigatus*) (Millner *et al.* 1980; Lacey 1991; Gumonski *et al.* 1992; Darragh *et al.* 1997; Fischer *et al.* 1998, 1999, 2000), but the full range of microbial diversity in composting bioaerosols remains poorly described.

The aim of this study was to characterize the microbial diversity of bioaerosols, collected at five open industrial composting plants, treating different types of waste (green waste, municipal solid waste, sludge from wastewater treatment plants, etc.) by a culture-independent approach. A common microbial signature was then looked for, and potential indicators of compost aerosols emitted into the air during pile turning were defined.

Materials and methods

Description of composting sites

Five French composting plants were chosen based on their different operational characteristics (type of waste treated, type of aeration, turning technology, geographical location). Five bioaerosol samples were collected, one at each of the five composting plants. All composting processes were operated in open windrow. Bioaerosols were collected during the turning of compost piles in the thermophilic phase. The turning was performed either by a wheel loader or a windrow turning machine. Table 1 lists the characteristics of the compost pile that was manipulated (waste, age, temperature), the technology used for the turning and the type of aeration. The compost piles were in trapezoidal cross-sectional windrows with an average height of 3 m. The size of compost piles at site B, treating solid municipal waste, was smaller (2 m on average). Therefore, several composting piles (five) were turned during the sampling to get enough material for analysis. For this site, the waste was first passed for 2-3 days in a rotating drum (DANO[®] drum tube), screened and was then formed into piles.

Air sample collection

Air samples were collected through the air biocollector Coriolis[®] μ (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France). The air sampler was located a few metres away from the turning machine, directly in the dusty cloud, at a height of 1.2 m above the ground. The sampling was based on cyclonic forces which enabled the biological particles to be collected from the air into a sterile solution of Tween 20 (Sigma, St Louis, MO, USA) 0.005% in 1 l milliQ water. The air samples were gathered over 30 min at a flow rate of 300 l min⁻¹. The solution was then filtered under sterile conditions on a 47-mm, 0.2- μ m polyethersulfone filter

Table 1 Characteristics of compost windrows and composting process

	Type of waste	Compost age (weeks)	Compost temperature (°C)	Technology used for windrow turning	Forced aeration
Site A	Green waste	8	50	Wheel loader	No
Site B	Solid municipal waste	3–4*	59–67	Windrow turning machine	No
Site C	Green waste and sludge	3	60	Wheel loader	Yes
Site D	Green waste, industrial biowaste, manure, mycelium, fats, waste from cosmetic industries	6	55	Wheel loader	Yes
Site E	Green waste and sludge	6	60	Wheel loader	Yes

*Several compost piles were turned

(Supor 200; Pall Corporation, Ann Arbor, MI). Sterile collecting liquid was used to wash the cone surface and recover remaining biological particles, and then filtered on the same filter. Each filter was kept frozen at -80°C in a 2 ml sterile tube until DNA extraction.

Extraction of total genomic DNA

DNA extraction was performed directly on the filter using the protocol described by Godon *et al.* (1997), with slight modifications. The filter was ground to powder using a sterile plastic stick, while maintained frozen. Volumes of 400 μl of 4 mol l^{-1} guanidine thiocyanate in 0.1 mol l^{-1} Tris-HCl (pH 7.5) and 120 μl of 10% N-lauroylsarcosine were then added. The filter was frozen at -20°C . A volume of 500 μl of 5% N-lauroylsarcosine in 0.1 mol l^{-1} phosphate buffer (pH 8) was added to the frozen filter, and the tube was immediately held at 95°C for 10 min. After the thermic treatment, samples were put in a vibroshaker along with zirconia beads of different sizes (1–0.06; 0.1; 0.5 mm in respective proportions of 1/2/1 in mass). Polyvinylpyrrolidone was then incorporated to remove inhibiting substances. DNA was precipitated using isopropanol, and RNA was removed by RNase treatment. Finally, the DNA was purified using the QIAamp DNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and collected in 30 μl of sterile water.

PCR Amplification and cloning of 16S rDNA and 18S rDNA fragments

SSU ribosomal DNA fragments with an average size of 500 bp were amplified to build five bacteria and five Eukaryota libraries (Godon *et al.* 1997). The bacterial forward primer W18 (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', positions F9-26) and the universal reverse primer W31 (5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3', positions R500-517) were used to amplify the 16S rDNA. Eukaryotic forward

primer W16 (5'-CTTAATTTGACTCAACACGG-3', positions F960–979) and universal reverse primer W02 (5'-GNTACCTTGTTACGACTT-3', positions R1492–1509) permitted the amplification of the 18S rDNA fragment. The reaction mixture was made up of 35 μl of water, 5 μl of Red Taq buffer (10X), 4 μl of dNTPs solution (2.5 mmol l^{-1}), 2 μl of each primer solution (100 ng μl^{-1}), 1 μl of Red Taq (Sigma), (2.5 U μl^{-1}) and 1 μl of DNA. The PCR conditions were as follows: an initial denaturation step of 2 min at 94°C ; 25 cycles (bacteria) or 30 cycles (Eukaryota) for 1 min at 94°C , 30 s at 50°C for the bacteria or 1 min at 47°C for Eukaryota and 1 min at 72°C ; and a final elongation for 10 min at 72°C . The size of the amplified products was checked visually in a 0.7% agarose gel with 1% of ethidium bromide. The amplified products were then purified by the QIAquick PCR purification kit (Qiagen). The PCR products purified were cloned into *E. coli* using the TOPO TA cloning kit for sequencing (Invitrogen, Carlsbad, NM, USA), according to the manufacturer's instructions. Each *E. coli* clone was purified on LB agar plates supplemented with kanamycin (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and then sent for sequencing after overnight incubation at 37°C (MilleGen, Toulouse, France). On average, 135 bacterial sequences and 35 eukaryotic sequences were obtained for each composting site.

Sequence analyses

Each sequence was cleaned from primers and plasmid sequences using BioEDIT ver. 7.0.9.0 (Hall 1999). Sequences were checked for chimeras using the chimera detection program from Ribosomal Database Project (RDP) II (Cole *et al.* 2003) and Bellerophon (Huber *et al.* 2004). Sequences were aligned by CLUSTAL W (Tompson *et al.* 1994), and a distance matrix was built with DNADIST (Felsenstein 1989) under BioEDIT. Phylotypes were defined at the level of 97% similarity by the DOTUR program (Schloss and Handelsman 2005). Each phylotype was compared to sequences in the GenBank and EMBL

databases with the BLASTN algorithm available through the National Center for Biotechnology Information (Altschul *et al.* 1990). Phylogenetic distribution of clones belonging to the Bacteria domain was performed according to Rappé and Giovannoni (2003). For fungi, affiliation was carried out in accordance with Hibbett *et al.* (2007).

The rarefaction curves were performed by DOTUR at 97% of similarity. The Simpson and S_{chao1} indices were calculated using the DOTUR program. Simpson was calculated as:

$$1 - H_{\text{Simpson}} = 1 - \left[\frac{\sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} S_i(S_i - 1)}{N(N - 1)} \right],$$

S_{obs} representing the number of species observed, S_i the number of individuals for one species and N the total number of species and S_{chao1} was calculated as: [$S_{\text{chao1}} = S_{\text{obs}} + n_1(n_1 - 1)/2(n_2 + 1)$], S_{obs} representing the number of species observed, n_1 the number of phylotypes with only one sequence and n_2 the number of phylotypes with only two sequences. Good's coverage was calculated as a percentage, according to the following relation $C = [1 - (n/N)] \times 100$, where n represented the number of phylotypes appearing only once in a library and N being the library size (Ravenschlag *et al.* 1999). For each phylotype, one sequence was deposited in the GenBank database. Accession numbers of bacterial and fungal nucleotide sequences were respectively FJ754668–FJ754887 and FJ754888–FJ754908. The bacterial and eukaryotic sequences were coded respectively as NA and EO for bioaerosol A, NC and EQ for bioaerosol B, NB and EP for bioaerosol C, Ni and ET for bioaerosol D and NE and ES for bioaerosol E. Identification of common phylotypes between the different bioaerosols was performed using the DOTUR program. To analyse the distribution in phyla of bacteria previously identified in compost (through culture and culture-independent approaches), 16S rDNA sequences were retrieved from the RDP public database (<http://rdp.cme.msu.edu/>) using the 'compost' keyword.

Results

Bacterial and fungal diversities in composting bioaerosols

Bioaerosols were collected during the turning of composting piles on five composting platforms. Bacteria and Eukaryota rDNA libraries were built for each of the five bioaerosols. From the five bacterial 16S rDNA libraries, 685 bacterial sequences were obtained. They were distributed in 220 phylotypes defined at 97% of similarity threshold. Concerning eukaryotic sequences, the 173

sequences obtained were distributed into 21 sequences of insects (dipterans, springtails), five sequences of nematodes, 16 sequences of protozoa, four sequences of plants (conifer, grass), five sequences of *Stramenopiles* (three oomycetes and two algae) and 122 sequences of fungi. Twenty-one fungal phylotypes were defined.

The microbial diversity of the bioaerosols was characterized using various parameters: rarefaction curves (Fig. 1), diversity indices and coverage (Table 2). Rarefaction curves indicated that the molecular analysis performed permitted only the identification of the dominant species in the bioaerosol, both for bacteria and fungi. The Simpson indices showed that the bacterial diversity was high for the five sites, while the S_{chao1} indices showed different abundancies. The bacterial coverage was higher than 70% for the A, B, D and E sites. The site C library had a much higher predicted bacterial diversity as given by S_{chao1} index than the other sites, together with a poor coverage rate (59%). The lowest values of the two diversity indices were obtained for the site B library. The fungal diversity was lower than the bacterial diversity and, for the B and E sites, one or two fungal species dominated (Simpson indices below 0.5). For the D and E sites, S_{chao1} values were the same (six phylotypes), while Simpson index values were different. Indeed, site E was dominated by one species in contrast to site D, which had a more diverse fungal diversity. The level of diversity of bacteria and fungi were very different, but the same tendency between sites was observed. Indeed, diversity was the lowest for site B and the highest for site C, for both bacteria and fungi.

Identification and proportion of the dominant micro-organisms

Table 3 gives the bacterial distribution at the phyla level for each composting site. Bacterial diversity was represented by eleven different phyla but was largely

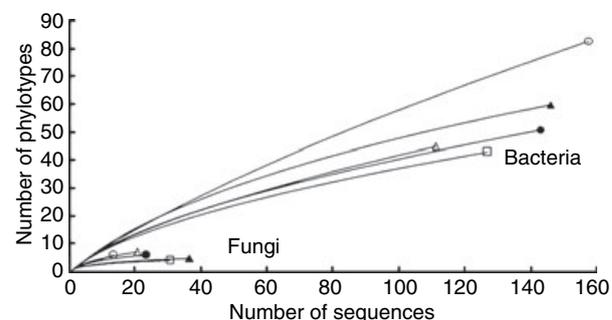


Figure 1 Rarefaction curves determined from 16S rDNA (Bacteria) and 18S rDNA (Eukaryota) libraries for composting bioaerosol A (Δ), B (□), C (○), D (●) and E (▲).

Table 2 Analysis of bacterial and fungal diversity in composting bioaerosols

Sites	Sequences number	Phylotypes number	Coverage C (%)	Diversity indices	
	Bacteria/fungi	Bacteria/fungi	Bacteria/fungi	S _{chao1}	Simpson*
Site A	111/20	45/7	72/80	161/10	0.935/0.768
Site B	127/30	43/4	80/97	89/4	0.923/0.402
Site C	158/13	83/6	59/62	307/16	0.946/0.641
Site D	143/23	51/6	77/91	156/6	0.946/0.715
Site E	146/36	60/5	77/94	107/6	0.970/0.495

*Simpson indice values are presented as 1-D for best readability, the diversity increasing from 0 (one species) to 1 (maximal diversity).

dominated by *Firmicutes* and *Actinobacteria*. Indeed, of the 220 bacterial phylotypes obtained overall for the five sites, 49.1% was assigned to *Firmicutes* and 37.2% to *Actinobacteria*. The remaining 13.7% was distributed between *Proteobacteria* (*Alpha*, *Beta* and *Gamma*), *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *Thermotogae* and TM7. TM7, *Planctomycetes* and *Thermotogae* were found only in one library. Even if the same tendencies were observed for the five sites (dominance of *Firmicutes* and *Actinobacteria*, presence of *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes* in all libraries), differences were observed from one site to another. The proportion of *Actinobacteria* was much higher for site B (78% of the sequences), the only site treating solid municipal waste. Phyla other than *Firmicutes* and *Actinobacteria* were well represented in sites C and E. In particular, the representativity of *Gamma-proteobacteria* was much higher in the site E bioaerosol (16%) than in the others (0–2.5%).

Bacteria in the bioaerosols were then identified by analysing similarities with 16S rDNA sequences present in public databases. The phylogenetic identification of each phylotype along with its abundancy in the different bioaerosols is given in Table 3. Only phylotypes with abundancy above 1% have been included in Table 3. A table giving the identification of all bacterial phylotypes is included as supplementary material. The dominant bacteria were represented by *Bacillus* sp., *Thermoactinomyces*, *Geobacillus* and *Planifilum* for *Firmicutes* and by *Saccharomonospora*, *Thermobifida* and *Saccharopolyspora* for *Actinobacteria*. *Gamma-proteobacteria* highly present in the site E bioaerosol mainly corresponded to *Acinetobacter* sp. Differences from one site to another were observed. The dominant *Actinobacteria* were *Saccharopolyspora* in the A bioaerosol, *Saccharomonospora* and *Saccharopolyspora* in the B, *Thermobifida* in the C and D and *Thermobifida*, *Corynebacterium* and *Microbacterium* in the E bioaerosol. Among the *Firmicutes*, dominant species also varied from one site to another: *Thermoactinomyces* dominated in A, *Thermoactinomyces*

and *Planifilum* in B and C, *Bacillus* in D and *Geobacillus* and *Planifilum* in E.

The fungal diversity in the bioaerosols was largely dominated by *Ascomycota* although *Basidiomycota*, *Microsporidia*, *Mucoromycotina* and *Entomophthoromycotina* were also present (Table 4). From the total number of phylotypes (21), 67% was assigned to *Ascomycota*, 19% to *Mucoromycotina* and the remaining phylotypes being distributed among the three other phyla. In the E bioaerosol, all fungi identified belonged to *Ascomycota*. *Mucoromycotina*, as well as *Ascomycota*, were present in the A, C and D bioaerosols, and *Entomophthoromycotina* in the B bioaerosol. The C bioaerosol presented the highest number of phyla with species belonging to *Ascomycota*, *Mucoromycotina*, *Basidiomycota* and *Microsporidia*. Table 4 shows the percentage of sequences of the different Eukaryota among the five bioaerosols and their phylogenetic positioning. The three dominant fungi were *Aspergillus*, *Penicillium* and *Thermomyces*. As for bacteria, major differences were observed from one site to another concerning the distribution of the different phylotypes. For the A bioaerosol, *Aspergillus fumigatus* (30%) and *Penicillium* (30%) dominated, whereas *Thermomyces* was highly dominant in the other four.

Origin of the closest relatives in public 16S rDNA databases

In order to decide whether the sequences obtained were affiliated to bacterial phylotypes previously identified in compost, the origin of the closest 16S rDNA sequences present in public databases was analysed for each phylotype. Origins obtained for each bioaerosol are gathered in Fig. 2. From the different sources involved (soil, water, compost, air, aerobic and anaerobic treatment processes, etc.), the two origins mainly observed were soil and compost. The percentage of sequences affiliated to compost varied from 28% (bioaerosol B) to 70% (bioaerosol D). A significant percentage of sequences linked to several environments was obtained for bioaerosols A (17%) and

Table 3 Phylogenetic positioning and abundance of bacterial phylotypes for the five composting bioaerosols. Only phylotypes with abundance above 1% in one bioaerosol or more are presented. Phylotypes common to three, four and five bioaerosols are presented respectively in light grey shading, dark grey shading and in white-on-black shade. The table was ranked by decreasing abundancies of phylotypes

Phylotypes	Percentage of sequences (%)					Closest relatives* (accession number)	Similarity (%)
	A	B	C	D	E		
<i>Firmicutes</i> (95 phylotypes, 328 sequences)							
Total	51.4	16.5	39.2	76.2	54.1		
NC11	0	3.1	3.8	8.4	6.8	<i>Planifilum yunnanensis</i> (DQ119659)	99
NA49	2.7	0	1.3	17.5	0	<i>Bacillus</i> sp. TAT105 (AB066342)	100
NA02	8.0	0	0	0	8.9	<i>Bacillus</i> sp. BGSC W9A68 (AY608954)	99
						<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i> (AY608951)	99
NA06	11.6	2.4	1.9	0.7	0	<i>Thermoactinomyces intermedius</i> (AF138734)	100
NA70	4.5	0	1.9	2.8	6.2	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> NG80-2 (CP000557)	100
NC38	0	0.8	1.9	5.6	0.7		
NB23	0	0	1.9	4.2	1.4	Compost bacterium clone 2B11 (DQ346495)	97
Ni32	0	0	0	2.1	4.1	<i>Bacillus</i> sp. '5-5LF 48TD' (EF112395)	99
						<i>Bacillus subtilis</i> (AB211021)	98
NA27	5.4	0	0	0.7	0		
NB04	0	0	3.8	0	2.1		
NB148	0	0	0.6	4.9	0	Bacterium clone biogas-DM2-b61 (DQ419583)	99
						<i>Planifilum fimeticola</i> (AB088364)	95
NB65	0	0	1.9	0	3.4	<i>Bacillus</i> sp. 5M04 (AM690037)	100
Ni94	0	0	0	4.2	0	Compost bacterium 4-11 (AB034705)	99
						<i>Bacillus</i> sp. TAT105 (AB066342)	98
NB89	0	0	0.6	3.5	0	<i>Ureibacillus</i> sp. MM196S (AB176540)	99
NC26	0	3.1	0	0.7	0		
NA66	3.6	0	0	0	0	<i>Bacillus</i> sp. SMCC G976 (EU446202)	100
NA75	2.7	0	0.6	0	0	<i>Bacillus smithii</i> (AB271749)	99
NA69	0.9	0	0.6	0	1.4	<i>Bacillus</i> sp. TP-84 (AJ002154)	98
NC139	0	0.8	0	2.1	0		
NA42	2.7	0	0	0	0		
Ni37	0	0	0	2.1	0	Compost bacterium 4-21 (AB034709)	98
NE94	0	0	0	0	2.1	<i>Ureibacillus koreensis</i> (DQ348072)	98
Ni168	0	0	0	1.4	0.7	<i>Bacillus coagulans</i> (AF466695)	100
Ni126	0	0	0	0.7	1.4		
Ni205	0	0	0	0.7	1.4		
NB52	0	0	1.3	0	0.7	Bacterium clone 2G4-119 (EU160333)	100
						<i>Bacillus</i> sp. S13 (AF403022)	99
NB25	0	0	1.9	0	0		
NC84	0	1.6	0	0	0	<i>Clostridium peptidovorans</i> (AF156796)	99
Ni28	0	0	0	1.4	0	Bacterium clone: CFB-4 (AB274493)	100
Ni255	0	0	0	1.4	0	<i>Symbiobacterium</i> sp. KY38 (AB361629)	100
						<i>Symbiobacterium thermophilum</i> (AP006840)	98
NE131	0	0	0	0	1.4	<i>Bacillus</i> sp. CFM6 (EU417661)	99
NC114	0	0.8	0.6	0	0	Bacterium clone SMC39 (AM183096)	100
						<i>Desemzia incerta</i> (Y17300)	100
NE46	0	0	0	0	1.4		
NE62	0	0	0	0	1.4		
NB78	0	0	1.3	0	0	Compost bacterium clone 5B01 (DQ346606)	97
						<i>Ammoniphilus oxalaticus</i> (Y14579)	96
NB82	0	0	1.3	0	0	Bacterium clone RL184_aan81c03 (DQ809588)	99
NB118	0	0	1.3	0	0		
<i>Actinobacteria</i> (63 phylotypes, 263 sequences)							
Total	36.0	78.0	44.3	20.3	17.1		
NA07	18.8	14.2	0.6	3.5	1.4	Bacterium isolate BF0002D063 (AM697552)	99
						<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> (X53194)	97
NC16	0	4.7	21.5	8.4	3.4	<i>Thermobifida fusca</i> (AM932257)	99

Table 3 (Continued)

Phylotypes	Percentage of sequences (%)					Closest relatives* (accession number)	Similarity (%)
	A	B	C	D	E		
NA55	2.7	22.0	0.6	0.7	0	<i>Saccharomonospora glauca</i> (AF139880)	99
NC07	0	8.7	6.3	2.8	0	<i>Saccharomonospora viridis</i> (Z38021)	99
NC09	0	2.4	2.5	0	0	<i>Kutzneria</i> sp. 744 (DQ181633)	95
NA113	0.9	0	0	0.7	2.7	<i>Actinobacterium</i> clone MT046 (AM157572)	99
						<i>Microbacterium</i> sp. oral clone AV005b (AF385527)	99
NC10	0	3.9	0	0	0	<i>Thermomonospora mesouiformis</i> (AF028247)	99
NC111	0	3.1	0.6	0	0	<i>Thermobifida fusca</i> (AM932257)	99
NA103	1.8	0	0	0	0.7	<i>Streptomyces</i> sp. HNL06 (EU373339)	99
NC137	0	2.4	0	0	0	<i>Saccharomonospora caesia</i> (Z38024)	97
NA43	1.8	0	0.6	0	0	<i>Streptomyces thermoviolaceus</i> (Z68095)	99
NA25	0.9	0	0	0	1.4	<i>Streptomyces cellulosa</i> (DQ442495)	100
NE01	0	0	0	0	2.1	Bacterium isolate BF0002A025 (AM696840)	98
						<i>Corynebacterium variabile</i> (AJ783438)	98
NA20	1.8	0	0	0	0	<i>Saccharopolyspora hirsuta</i> (DQ381814)	99
NC60	0	1.6	0	0	0	<i>Nocardiopsis composita</i> (AB368717)	100
NC72	0	1.6	0	0	0	<i>Streptomyces thermoatroviridis</i> (AB184586)	100
NC86	0	1.6	0	0	0	<i>Corynebacterium</i> sp. BBDP55 (DQ337519)	99
						<i>Corynebacterium efficiens</i> (AB055965)	98
NC121	0	1.6	0	0	0	<i>Thermocristum agreste</i> (X79183)	99
NC03	0	1.6	0	0	0		
NE33	0	0	0	0	1.4	<i>Corynebacterium</i> sp. clone TCCC (EU567065)	99
						<i>Corynebacterium glutamicum</i> (BA000036)	99
NE126	0	0	0	0	1.4	<i>Thermocristum municipale</i> (X79184)	99
Ni189	0	0	0	1.4	0		
NB102	0	0	1.3	0	0	<i>Actinomadura hallensis</i> (DQ076484)	98
<i>Alphaproteobacteria</i> (17 phylotypes, 23 sequences)							
Total	6.3	1.6	6.1	0.7	2.1		
NA03	1.0	0	1.0	0	0	<i>Proteobacterium</i> clone (DQ828902)	98
						<i>Mesorhizobium</i> sp. Q-2 (AB246806)	99
NE56	0	0	0	0	1.4	Bacterium clone PR12 (DQ98332)	98
						Alpha proteobacterium (AY922042)	98
NB74	0	0	1.3	0	0	<i>Devosia</i> sp. R-21940 (AJ786801)	99
<i>Gammaproteobacteria</i> (11 phylotypes, 31 sequences)							
Total	1.8	0.8	2.5	0	16.4		
NE12	0	0	0	0	6.8	<i>Acinetobacter</i> sp. Epbas6 (EU252078)	99
NB39	0	0	0.6	0	6.2	Clone AKIW445 (DQ129592)	100
						<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (DQ518606)	99
NE38	0	0	0	0	2.1	Clone 4-B (EU305591)	99
						<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> (AJ550856)	98
<i>Betaproteobacteria</i> (four phylotypes, four sequences)							
Total	0.9	0	1.0	0	1.4		
<i>Bacteroidetes</i> (20 phylotypes, 26 sequences)							
Total	3.6	1.6	4.4	1.4	7.5		
NE34	0	0	0	0	2.7	Clone ORSAT_e12 (EF393132)	98
						<i>Flavobacteriaceae bacterium</i> JJC (EU523664)	96
NA83	1.8	0	0	0	0	<i>Taxeobacter</i> sp. EB54 (AM265541)	96
<i>Chloroflexi</i> (five phylotypes, five sequences)							
Total	0	1.6	1.3	0.7	0		
<i>Gemmatimonadetes</i> (two phylotypes, two sequences)							
Total	0	0	0.6	0	1.0		
<i>Planctomycetes</i> (one phylotype, one sequence)							
Total	0	0	1.0	0	0		
<i>Thermotogae</i> (one phylotype, one sequence)							
Total	0	0	0	1.0	0		
TM7 (one phylotype, one sequence)							
Total	0	0	0	0	1.0		

*Only sequences from closest relatives with similarity percentage above 95% are presented.

Table 4 Phylogenetic positioning and abundance of fungal phylotypes. Phylotypes common to four and five bioaerosols are presented respectively in grey shading and in white-on-black shade. The table was ranked by decreasing abundances of phylotypes

Phylotypes	Percentage of sequences (%)					Closest relatives* (accession number)	Similarity (%)
	A	B	C	D	E		
Fungi (21 phylotypes, 122 sequences)							
Total	57.1	78.9	43.3	71.9	94.7		
Ascomycota (14 phylotypes, 110 sequences)							
Total	85.0	86.7	69.2	95.7	100		
EO14	5.0	76.7	53.8	39.1	55.6	<i>Thermomyces lanuginosus</i> (AY706335)	99
EO40	30.0	0	7.7	8.7	11.1	<i>Penicillium</i> sp. MG-2007 (EF611042)	100
EO13	25.0	6.7	0	8.7	8.3	<i>Aspergillus fumigatus</i> (AF548063)	100
ET25	0	0	0	26.1	0	Clone <i>Streu_b_24</i> (EF629282)	100
						<i>Cladosporium</i> sp. (EU167592)	100
ES08	0	0	0	0	17.0	Clone biogas-DI-e40 (DQ430752)	99
						<i>Marcellina personii</i> (DQ646534)	95
EO22	10.0	0	0	0	3.0	<i>Talaromyces byssochlamydoideus</i> (AB023950)	100
ET20	0	0	0	8.7	2.8	<i>Madurella mycetomatis</i> (AF527811)	99
EP28	0	0	7.7	0	0	<i>Chalara hyalina</i> (AF222509)	98
EO51	5.0	0	0	0	0	<i>Aspergillus fumigatus</i> (AF548063)	98
EO48	5.0	0	0	0	0	<i>Geotrichum candidum</i> (AB000652)	100
EO02	5.0	0	0	0	0	<i>Pichia guilliermondii</i> (EF532297)	99
ET16	0	0	0	4.3	0	<i>Phoma</i> sp. sh1 (AB252869)	99
EQ12	0	3.3	0	0	0	Clone <i>DRV-E056</i> (AY923090)	94
						<i>Ascobolus carbonarius</i> (AY544720)	94
ES41	0	0	0	0	2.8	Clone biogas-DI-e40 (DQ430752)	96
Mucoromycotina (four phylotypes, six sequences)							
Total	15.0	0	15.4	4.3	0		
EO16	10.0	0	7.7	0	0	Clone T3_II_2a_37 (EF628602)	100
						<i>Mucor plumbeus</i> (AF548078)	100
EP16	0	0	7.7	0	0	<i>Pilobolus sphaerosporus</i> (EU595653)	100
EO28	5.0	0	0	0	0	<i>Absidia corymbifera</i> (AF113408)	99
ET18	0	0	0	4.3	0	<i>Circinella umbellata</i> (AF157128)	98
Entomophthoromycotina (one phylotype, four sequences)							
Total	0	13.3	0	0	0		
EQ07	0	13.3	0	0	0	<i>Furia ithacensis</i> (AF351134)	99
Basidiomycota (one phylotype, one sequences)							
Total	0	0	7.7	0	0		
EP02	0	0	7.7	0	0	Clone biogas-DI-e11 (DQ430753)	100
						<i>Ustilago hordei</i> (U00973)	100
Microsporidia (one phylotype, one sequence)							
Total	0	0	7.7	0	0		
EP06	0	0	7.7	0	0		
Others eukaryota (51 sequences)							
Total	42.9	21.1	56.7	28.1	5.3		
Protozoa (16 sequences)							
Total	5.7	0	30.0	15.6	0		
Euglenida (one sequence)							
Total	0	0	3.3	0	0		
EP22	0	0	3.3	0	0	<i>Sphenomonad euglenozoan</i> (AY821957)	98
Cercozoa (two sequences)							
Total	0	0	3.3	3.1	0		
EP14	0	0	3.3	0	0	Freshwater cercozoan (DQ243996)	97
ET63	0	0	0	3.1	0	<i>Heteromita globosa</i> (HGU42447)	98
Intramacronucleata (two sequences)							
Total	0	0	3.3	3.1	0		
EP03	0	0	3.3	0	0	<i>Oxytricha granulifera</i> (AM412772)	95
ET68	0	0	0	3.1	0	<i>Pseudoplatyphrya nana</i> (AF060452)	100

Table 4 (Continued)

Phylotypes	Percentage of sequences (%)					Closest relatives* (accession number)	Similarity (%)
	A	B	C	D	E		
<i>Stramenopiles</i> (five sequences)							
Total	0	0	6.7	6.3	2.6		
<i>Oomycetes</i> (three sequences)							
Total	0	0	6.7	3.1	0		
EP04	0	0	6.7	0	0	<i>Achlya bisexualis</i> (DQ403201)	99
ET62	0	0	0	3.1	0	<i>Hyaloperonospora parasitica</i> (AY742752)	100
<i>Synurophyceae</i> (two sequences)							
Total	0	0	0	3.1	2.6		
ET65	0	0	0	3.1	0	<i>Uroglena</i> sp. CCMP2768 (EF165132)	95
ES29	0	0	0	0	2.6	<i>Uroglena</i> sp. CCMP2768 (EF165132)	95
<i>Nematoda</i> (five sequences)							
Total	2.9	0	6.7	3.1	2.6		
<i>Streptophyta</i> (four sequences)							
Total	5.7	0	3.3	3.1	0		
<i>Insecta</i> (21 sequences)							
Total	28.6	21.1	10.0	0	0		

*Only sequences from closest relatives with similarity percentage above 95% are presented.

E (20%). The fact that the closest relatives in public databases originated mainly from compost samples confirmed that the dominant bacteria identified in this study came from the compost and had been released during the turning of the composting pile. This compost origin was also confirmed by the dominance of thermophilic species, linked to the fact that the composts were in their thermophilic phase at the time of sampling. Indeed, the bioaerosols harboured a high diversity of thermophilic bacteria belonging to *Geobacillus*, *Planifilum*, *Bacillus*, *Clostridium* and thermophilic actinomycetes (*Thermoactinomyces*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Thermobifida*, *Streptomyces*, *Thermomonospora*, *Nocardiopsis*, *Thermocristum*, etc.). Among the less dominant phylotypes, some sequences previously found in several environments corresponded to ubiquitous and/or psychrophilic bacteria (*Planococcus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Pedobacter*, *Chryseobacterium*, etc.).

Identification of core species common to several bioaerosols

Beyond the description of microbial diversity in composting bioaerosols, the objective of this research was to look for phylotypes common to several bioaerosols that would represent a microbial signature of compost aerosols. A significant number of bacterial phylotypes were indeed common to several bioaerosols; they are presented in grey shadings in Table 3. Thirty-two phylotypes (gathering 150 sequences) were common to two sites, five phylotypes (76 sequences) to three sites and six phylotypes

(176 sequences) to four sites. Only one phylotype was present in the five bioaerosols; it represented 6.9% of total sequences and had 97% similarity with *Saccharopolyspora rectivirgula*. The six phylotypes found in four libraries were close to *Planifilum yunnanense*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Thermactinomyces intermedius*, a *Thermoactinomycetaceae* sp., *Thermobifida fusca* and *Saccharomonospora glauca*. Fungi common to different bioaerosols could also be identified: three phylotypes were common to two sites (gathering nine sequences), two phylotypes to four sites (gathering 25 sequences) and only one phylotype was present in the five libraries. It was affiliated to *Thermomyces lanuginosus*, which gathered 49% of fungal sequences, and was differently represented in the five bioaerosols: 5% in A, 77% in B, 54% in C, 39% in D and 56% in E. The two phylotypes common to four libraries were close to a *Penicillium* sp. (10.6% of fungal sequences) and to *Aspergillus fumigatus* (10.6% of fungal sequences). *Aspergillus fumigatus* was found in all composting bioaerosols apart from C.

Discussion

Bioaerosols produced during composting have never been described in their overall microbial diversity. Using culture-independent techniques, this study reports the description of the diversity of bacteria and Eukaryota in bioaerosols released at five different composting sites during the turning of composting piles. The objective was to compare five bioaerosols originating from different industrial sites to see whether a common microbial signature

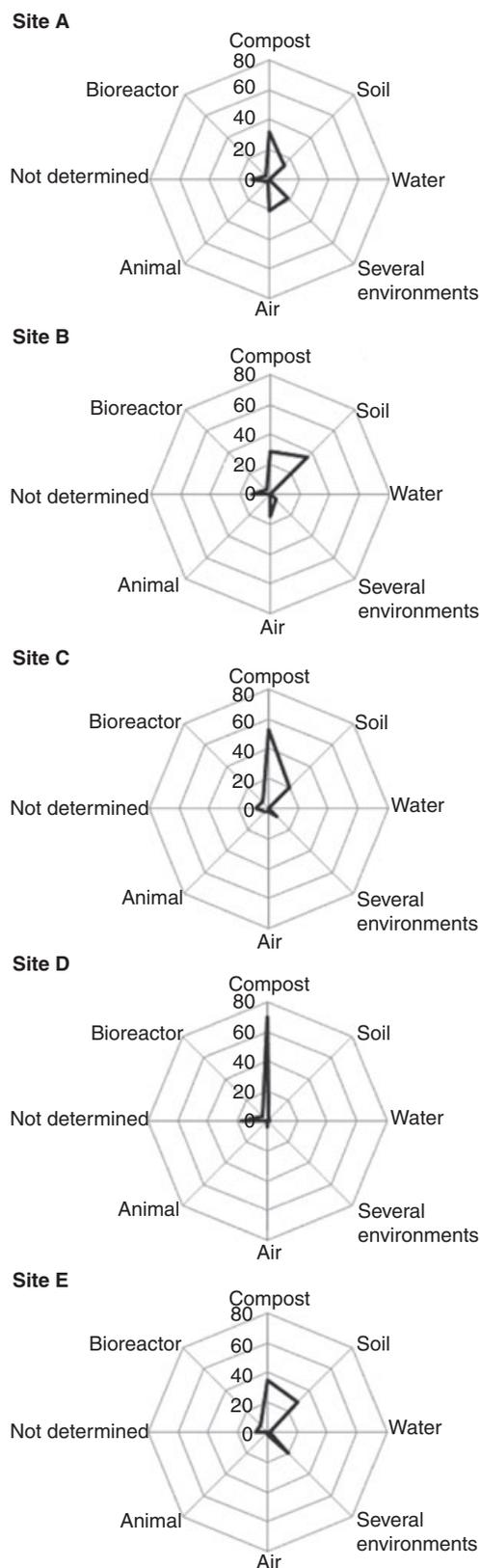


Table 5 Distribution of bacteria at the phyla level in composting bioaerosols (average values obtained from the five different bioaerosols) and for compost (sequences retrieved from RDP database)

Phyla	Percentage of sequences (%)	
	Bioaerosols* (this study)	Composts (RDP)
<i>Firmicutes</i>	49.1	43.4
<i>Actinobacteria</i>	37.2	12.0
<i>Alpha-proteobacteria</i>	3.4	5.5
<i>Beta-proteobacteria</i>	0.6	6.0
<i>Gamma-proteobacteria</i>	4.5	10.3
<i>Bacteroidetes</i>	3.8	13.4
<i>Chloroflexi</i>	0.7	0.4
<i>Gemmatimonadetes</i>	0.3	0.3
TM7	0.1	0.1
<i>Planctomycetes</i>	0.1	0.1
<i>Thermotogae</i>	0.1	–
<i>Delta Proteobacteria</i>	–	1.8
<i>Acidobacteria</i>	–	0.8
<i>Deinococcus-Thermus</i>	–	0.5
<i>Verrucomicrobia</i>	–	0.4
<i>Cyanobacteria</i>	–	0.2
not classified	–	4.9

*Average distribution based on values from the five bioaerosols.

could be defined, even when originating from composts made up of different wastes and managed by different processes.

Origin of micro-organisms recovered from the bioaerosols

During the turning of composting piles, bioaerosols are released into a nonsterile environment, air (Stetzenbach 2002). Thus, micro-organisms gathered by sampling may originate either from the compost or from the surrounding air. Because the aim of the study was to identify microbial indicators of a compost origin present in the air, the question of the origin of the micro-organisms identified was critical. *Ascomycota* and the dominant bacterial genera found in the bioaerosols (*Bacillus*, *Geobacillus*, *Planifilum*, *Thermoactinomyces*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*, *Thermobifida*, *Penicillium* and *Aspergil-*

Figure 2 Environmental origin of the closest bacterial relatives in public databases according to 16S rDNA similarities (BLAST). The closest bacterial relatives recovered from several environments are shown under the 'several environments' denomination. The 'not determined' denomination corresponds to sequences for which the environment of the closest relatives is not provided in the database, as well as to sequences having less than 95% similarity with their closest relatives. The term 'Bioreactor' was used for aerobic and anaerobic treatment processes.

lus) had been previously described in the literature as part of the compost microflora (Strom 1985; Blanc *et al.* 1997, 1999; Herrmann and Shann 1997; Dees and Ghiorse 2001; Ryckeboer *et al.* 2003; Swan *et al.* 2003; Cahyani *et al.* 2004; Anastasi *et al.* 2005). This, together with the fact that only thermophilic species were mainly recovered, confirmed that the micro-organisms studied were aerosolized from the composts, which were at temperatures of 50–60°C. The compost origin of bacteria was also demonstrated by analysing the origin of the closest relatives in public 16S rDNA databases. Furthermore, some micro-organisms gathered in this study had been previously described in composting bioaerosols. Indeed, actinomycetes, *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium* are dominant culturable micro-organisms in composting bioaerosols (Lacey 1991; Fischer *et al.* 1999; Hryhorczuk *et al.* 2001; Kampf *et al.* 2002; Ryckeboer *et al.* 2003). Actinomycetes and *Aspergillus fumigatus* have been used by some authors to represent viable bioaerosols (Taha *et al.* 2005). *Saccharomonospora viridis*, *Streptomyces* and *Thermoactinomyces vulgaris* have been previously identified as released during the piling of compost using a front-end loader (Millner *et al.* 1980).

Among the less dominant phylotypes, some bacteria were associated with several environmental origins and/or belong to psychrophilic species: *Planococcus*, *Aerococcus*, *Micrococcus*, *Parococcus*, *Acinetobacter*, *Pedobacter* or *Chryseobacterium*. *Planococcus* sp. was found in rumen, glacier ice or sediments. *Parococcus* sp. came from soil, aircraft cabin air, a clean room, the atmosphere of the Pacific Ocean or Eastern Mediterranean. *Aerococcus* sp. was found in marine water, deep subsurface, digestive tract or aircraft cabin air. These bacteria probably originate from the surrounding air rather than from composts. Although most micro-organisms collected were aerosolized from compost, the input of the background microflora from air was, then, not nil.

Dominance of sporulating *Firmicutes* and *Actinobacteria* in bioaerosols

Compiling all sequences present in the RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>), obtained from previous studies on compost (about 4000 sequences), showed the dominance in compost of *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* and *Actinobacteria*. Other sequences (less than 10%) were distributed between nonaffiliated uncultured sequences and eight other phyla, each of them gathering less than 1% of the total number of sequences: *Acidobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia*, *Gemmatimonadetes*, *Cyanobacteria*, *Planctomycetes* and TM7. Table 5 enables us to compare the distribution of bacteria in different phyla for compost (RDP) and for

composting bioaerosols (average values obtained from the five different bioaerosols of this study). The representativity of the different phyla differs between the bioaerosols and their source, i.e. the compost. In bioaerosols, *Firmicutes* and *Actinobacteria* appear as the dominant phyla, whereas in compost, *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* are also highly represented. In compost, *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* are even more dominant than *Actinobacteria*. Two hypotheses could explain the high representativity of *Actinobacteria* in the bioaerosol. First, samples were collected during the thermophilic phase. High temperatures would favour sporulating species, such as *Bacillus* or *Actinobacteria*. *Bacteroides* species, non-sporulating and nonthermophilic, would, therefore, be less represented during the thermophilic phase, their representativity increasing later during compost maturing. Such was the case in a study on the diversity and succession of microbial communities during garbage processing: the dominant bacterial group changed from the phylum *Firmicutes* in the thermophilic stage to the phylum *Bacteroidetes* in the maturing stage (Takaku *et al.* 2006). Other studies have shown the dominance of *Actinobacteria* during thermophilic composting (Tang *et al.* 2007; Yu *et al.* 2007) and the dominance of *Bacteroidetes* in the maturation phase (Danon *et al.* 2008; Vaz-Moreira *et al.* 2008). The second hypothesis that could explain the dominance of *Actinobacteria* and *Firmicutes* in bioaerosols is that a selection of sporulating species occurs during aerosolization. Because high temperature and a decrease in available substrates favours sporulation during the thermophilic phase, *Actinobacteria* and *Firmicutes* may be present as spores in the compost. Nielsen *et al.* (1997) analysed the concentration of micro-organisms in bioaerosols related to the concentration in bulk samples of compost from household waste. They found that actinomycetes or their spores were particularly prone to be airborne. Our study confirmed the high representativity of actinomycetes in bioaerosols, compared to the known phyla distribution in compost. The ability of micro-organisms to become airborne is dependent on several conditions, including the materials in which they grow and the physical characteristics of the species. Bacteria often stick to particles or surfaces, while airborne spores from moulds and actinomycetes are more easily spread in the air (Nielsen *et al.* 1995). Because of their small size (1–3 µm), spores from actinomycetes can easily become airborne and spread via the bioaerosol when such a highly-colonized material as compost is disturbed (Taha *et al.* 2005, 2006). The velocity of suspended organisms is indeed dependent on the size of the spore. Thus, the spores of *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* and *Actinobacteria* (1–3 µm) have a velocity of 0.03 cm s⁻¹, while the spores of *Alternaria* (30 µm) have a velocity of 10 cm s⁻¹ (Stetzenbach 1992).

Comparison between the five composting bioaerosols and definition of core species

The comparison of the five bioaerosols showed similarities at the phyla level, with *Ascomycota* being largely dominant for fungi and *Firmicutes* and *Actinobacteria* for bacteria. Diversity indices were also in the same range, high for bacteria, lower for fungi. Furthermore, some bacterial and fungal species were recovered in several or even in all bioaerosols and belonged to the dominant components of the bioaerosol. At the genus level, on the other hand, big differences in the distribution of the dominant species were observed from one site to another. Our results showed that a common microbial signature emerged from the different composting bioaerosols. Indeed, although the five bioaerosols studied were collected from five different composting platforms treating different types of waste, several phylotypes common to at least four sites were identified: seven phylotypes for bacteria and three for fungi. The large number of shared phylotypes obtained in this study from different industrial composting sites may be because of the fact that all composts manipulated during the sampling were in the thermophilic phase. Indeed, many of the species recovered and the common phylotypes in particular, were thermophilic species. The selection pressure induced by high temperature may have enabled the multiplication of the same micro-organisms, even starting from very different microbial communities. The aerosolization may then have constituted a second selection process, favouring species readily airborne, such as bacteria and fungi producing small-sized spores. Thermophily and the ability to sporulate may thus have been the two main parameters favouring core species from the whole compost microbial diversity, and this is true for all the five compost piles studied. Those core species could then be present in any bioaerosols produced during operational activities on composting piles in fermentation. It would be interesting to see if they are also present at later stages during the composting process.

Ecology of core species

The importance of *Thermomyces lanuginosus* in composting bioaerosols constitutes a new finding. Indeed, it has not been reported among dominant fungi in composting bioaerosols, although it has been previously isolated from compost (Tuomela *et al.* 2000; Anastasi *et al.* 2005). *Thermomyces lanuginosus* can decompose cellulose, hemicellulose and even lignin and was found as dominant in compost after peak heating, together with *Aspergillus* sp. (Tuomela *et al.* 2000). In our study, this fungus was not only present but also dominated in bioaerosols B and E

(77% and 56% of the total number of fungal sequences). On the other hand, the presence of *Aspergillus* and *Penicillium* was not surprising because these two fungi are among the most abundant in composting processes (Albrecht *et al.* 2008) and are known to be dispersed into the air in large numbers during compost manipulation. Among bacteria, *Geobacillus* species, including *Geobacillus thermodenitrificans*, have been described in compost (Zhang *et al.* 2002) and can even represent the dominant bacteria among the *Firmicutes* during the thermophilic phase (Takaku *et al.* 2006). The *Planifilum* genus was described in 2005. It belongs to the *Thermoactinomycetaceae* family and groups three species: *Planifilum yunnanense*, isolated from a hot spring in China, *Planifilum fimeticola* and *Planifilum fulgidum*, isolated from compost (Zhang *et al.* 2007). *Thermoactinomyces intermedius*, *Thermobifida fusca* and *Saccharomonospora* are all known components of the compost microflora (Song *et al.* 2001; Steger *et al.* 2007). Most, then, if not all, core species of the bioaerosols studied originated from compost and not from micro-organisms in the surrounding air.

Some of the species identified in this study are associated with respiratory symptoms. *Aspergillus fumigatus* is an opportunistic fungal pathogen which under prolonged exposure conditions may cause invasive aspergillosis in immuno-compromised individuals (Shen *et al.* 2004; Taha *et al.* 2006). Airborne thermophilic actinomycetes such as *Thermoactinomyces vulgaris* and *Saccharopolyspora rectivirgula* are implicated in hypersensitivity-induced pneumonitis and other allergic reactions such as alveolitis or bronchial asthma (Lacey and Crook 1988; Dutkiewicz *et al.* 1994; Poulsen *et al.* 1995; Kampf *et al.* 2002; Stetzenbach 2002; Albrecht *et al.* 2008). Their monitoring would provide information on the exposure of workers or local residents to specific microbial groups when no data are currently available on the dispersal of specific bacteria or fungi. Being sporulating micro-organisms, they may be able to survive long-distance transport by air. Of all the micro-organisms released in bioaerosols from the composting platforms, it is these that may be the cause of greatest concern if dispersed into the surrounding environment.

Potential microbial indicators of composting bioaerosols

There is a major lack of knowledge concerning microbial groups that could be monitored in order to analyse the emission and dispersal of composting bioaerosols. The United Kingdom Composting Association has proposed a procedure for monitoring bioaerosol, based on the monitoring of two airborne groups, *Aspergillus fumigatus* and total mesophilic bacteria, at different upwind and downwind locations at a composting plant (Sánchez-Monedero

and Stentiford 2003). The indicators of compost bioaerosols to be looked for should be present in compost and absent, or present at low concentrations, in other environments. Thermophilic species appear to be good candidates because they multiply during the composting process but are not thought to occur naturally in air where cold conditions prevail. Thermophilic actinomycetes like *Thermoactinomyces* and *Saccharomonospora* and thermotolerant microfungi have been put forward as potential indicators because they are rare in natural environments because of their thermotolerant or obligatory thermophilic characteristics (Neef *et al.* 1999). Their concentrations in air samples in the surroundings of composting plants are indeed higher than in background samples (Kämpfer *et al.* 2002; Neef *et al.* 2003; Swan *et al.* 2003; Albrecht *et al.* 2008; Fischer *et al.* 2008). However, they play an important role in other habitats where decomposition of organic matter takes place at elevated temperature and under aerobic conditions (e.g. improperly stored hay, cereal grains, manure, straw, etc.) and are not specific to a compost origin (Song *et al.* 2001). *Aspergillus fumigatus* is common in the environment but its concentration increases when there are sources of self-heating materials. For some authors, therefore, dominance of *Aspergillus fumigatus* in the downwind vicinity of a composting plant is an indication for the release of emissions from the plant (Albrecht *et al.* 2008). A good indicator need not be necessarily completely absent from other environments but its background level has to be determined and must be of several orders of magnitude below the concentration in the emitted bioaerosols.

No consensus currently exists on validated bioindicators of a compost origin in air samples. Furthermore, no extensive search for new indicators by analysing the microbial diversity in composting bioaerosols has been previously carried out. The approach that we have chosen, i.e. to look for indicators by the comparison of the microbial diversity in bioaerosols collected from different composting platforms, is therefore original. This study has confirmed the potential of thermophilic actinomycetes and thermotolerant microfungi as indicators and, further, has identified phylotypes among these two groups that could be used. Moreover, the study has demonstrated the potential interest of micro-organisms that cannot yet be suggested as indicators, given the current knowledge on compost bioaerosols (*Thermomyces lanuginosus*).

This study is the first to gather molecular data on bioaerosols released from five different industrial composting sites. It thus improves our knowledge of dominant bacteria and fungi released in air during composting and, in particular, confirmed the high representativity of sporulating species. The comparison of five different bioaerosols has shown variation from one composting site to

another in phylotype distribution but also close similarities: the dominance of *Ascomycota*, *Firmicutes* and *Actinobacteria* in all bioaerosols; bacterial and fungal phylotypes present in all or in most bioaerosols. As a conclusion, working with aerosols produced during the thermophilic phase of the process made it possible to define phylogenetic groups common to different aerosols. This microbial signature of composting bioaerosols will be useful for defining bioindicators. In particular, several bacterial and fungal species identified in this study could well represent good indicators that might be used during bioaerosol air dispersal studies and risk assessment analysis.

Acknowledgements

We are grateful to Veolia Propreté and to employees at the different composting sites for their help during the sampling campaigns. This work was supported financially by the Languedoc-Roussillon Regional Government Council (France) and the French Agency for Environmental and Energy Management (ADEME) (ADEME, Contract no. 0375C0033).

References

- Albrecht, A., Fischer, G., Brunemann-Stubbe, G., Jäckel, U. and Kämpfer, P. (2008) Recommendations for study design and sampling strategies for airborne microorganisms, MVOC and odours in the surrounding of composting facilities. *Int J Hyg Environ Health* **211**, 121–131.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403–410.
- Anastasi, A., Varese, G.C. and Marchisio, V.F. (2005) Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. *Mycologia* **97**, 33–44.
- Blanc, M., Marilley, L., Beffa, T. and Aragno, M. (1997) Rapid identification of heterotrophic, thermophilic, spore-forming bacteria isolated from hot composts. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1246–1248.
- Blanc, M., Marilley, L., Beffa, T. and Aragno, M. (1999) Thermophilic bacterial communities in hot composts as revealed by most probable number counts and molecular (16S rDNA) methods. *FEMS Microbiol Ecol* **28**, 141–149.
- Browne, M.L., Ju, C.L., Recer, G.M., Kallenbach, L.R., Melius, J.M. and Horn, E.G. (2001) A prospective study of health symptoms and *Aspergillus fumigatus* spore counts near a grass and leaf composting facility. *Compost Sci Util* **9**, 241–249.
- Bünger, J., Schappler-Scheele, B., Hilgers, R. and Hallier, E. (2007) A 5-year follow-up study on respiratory disorders and lung function in workers exposed to organic dust from composting plants. *Int Arch Occup Environ Health* **80**, 306–312.

- Cahyani, V.R., Matsuya, K., Asakawa, S. and Kimura, M. (2004) Succession and phylogenetic profile of eukaryotic communities in the composting process of rice straw estimated by PCR-DGGE analysis. *Biol Fertil Soils* **40**, 334–344.
- Cobb, N., Sullivan, P. and Etzel, R. (1995) Pilot study of health complaints associated with commercial processing of mushroom compost in southeastern Pennsylvania. *J Agromedicine* **2**, 13–25.
- Cole, J.R., Chai, B., Marsh, T.L., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., Chandra, S., McGarrell, D.M. *et al.* (2003) The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res* **31**, 442–443.
- Danon, M., Franke-Whittle, I.H., Insam, H., Chen, Y. and Hadar, Y. (2008) Molecular analysis of bacterial community succession during prolonged compost curing. *FEMS Microbiol Ecol* **65**, 133–144.
- Darragh, A., Buchan, R., Sandfort, D. and Coleman, R. (1997) Quantification of air contaminants at a municipal sewage sludge composting facility. *Appl Occup Environ Hyg* **12**, 190–194.
- Dees, P.M. and Ghiorse, W.C. (2001) Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. *FEMS Microbiol Ecol* **35**, 207–216.
- Douwes, J., Heederik, D., Douwes, J., Pearce, N. and Thorne, P. (2003) Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann Occup Hyg* **47**, 187–200.
- Dutkiewicz, J., Pomorski, Z.J.H., Sitkowska, J., Krysinskatracyk, E., Skorska, C., Prazmo, Z., Cholewa, G. and Wojtowicz, H. (1994) Airborne microorganisms and endotoxin in animal houses. *Grana* **33**, 85–90.
- Felsenstein, J. (1989) PHYLIP – Phylogeny inference package (Version 3.2). *Cladistics* **5**, 164–166.
- Fischer, G., Schwalbe, R., Ostrowski, R. and Dott, W. (1998) Airborne fungi and their secondary metabolites in working places in a compost facility. *Mycoses* **41**, 383–388.
- Fischer, G., Muller, T., Ostrowski, R. and Dott, W. (1999) Mycotoxins of *Aspergillus fumigatus* in pure culture and in native bioaerosols from compost facilities. *Chemosphere* **38**, 1745–1755.
- Fischer, G., Muller, T., Schwalbe, R., Ostrowski, R. and Dott, W. (2000) Exposure to airborne fungi, MVOC and mycotoxins in biowaste-handling facilities. *Int J Hyg Environ Health* **203**, 97–104.
- Fischer, G., Albrecht, A., Jackel, U. and Kampfer, P. (2008) Analysis of airborne microorganisms, MVOC and odour in the surrounding of composting facilities and implications for future investigations. *Int J Hyg Environ Health* **211**, 132–142.
- Fracchia, L., Pietronave, S., Rinaldi, M. and Martinotti, M.G. (2006) The assessment of airborne bacterial contamination in three composting plants revealed site-related biological hazard and seasonal variations. *J Appl Microbiol* **100**, 973–984.
- Godon, J.-J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, F. and Moletta, R. (1997) Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2802–2813.
- Gumonski, P.I., Dunoyer Geindre, S. and Latge, J.P. (1992) Evaluation of occupational risk factors for the workers in municipal composting facilities. *Eur Respir J* **5**, 406–407.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**, 95–98.
- Hansgate, A.M., Schloss, P.D., Hay, A.G. and Walker, L.P. (2005) Molecular characterization of fungal community dynamics in the initial stages of composting. *FEMS Microbiol Ecol* **51**, 209–214.
- Heida, H., Bartman, F. and Vanderzee, S.C. (1995) Occupational exposure and indoor air-quality monitoring in a composting facility. *Am Ind Hyg Assoc J* **56**, 39–43.
- Herr, C.E.W., Nieden, A., Jankofsky, M., Stilianakis, N.I., Boedeker, R.-H. and Eikmann, T.F. (2003) Effects of bioaerosol polluted outdoor air on airways of residents: a cross sectional study. *Occup Environ Med* **60**, 336–342.
- Herrmann, R.F. and Shann, J.F. (1997) Microbial community changes during the composting of municipal solid waste. *Microb Ecol* **33**, 78–85.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T. *et al.* (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* **111**, 509–547.
- Hryhorczuk, D., Curtis, L., Scheff, P., Chung, J., Rizzo, M., Lewis, C., Keys, N. and Moomey, M. (2001) Bioaerosol emissions from a suburban yard waste composting facility. *Ann Agric Environ Med* **8**, 177–185.
- Huber, T., Faulkner, G. and Hugenholtz, P. (2004) Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequences alignments. *Bioinformatics* **20**, 2317–2319.
- Ishii, K., Fukui, M. and Takii, S. (2000) Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *J Appl Microbiol* **89**, 768–777.
- Kampfer, P., Jureit, C., Albrecht, A. and Neef, A. (2002) Immission of microorganisms from composting facilities. In *Microbiology of Composting* ed. Klammer, S. pp. 571–584. Berlin: Springer.
- Lacey, J. (1991) *Airborne Microorganisms Associated with Domestic Waste Composting*. Stevenage, UK: Warren Spring Laboratory.
- Lacey, J. and Crook, B. (1988) Fungal and actinomycete spores as pollutants of the workplace and occupational allergens. *Ann Occup Hyg* **32**, 15–533.
- Marchand, G., Lavoie, J. and Lazure, L. (1995) Evaluation of bioaerosols in a municipal solid-waste recycling and composting plant. *J Air Waste Manag Assoc* **45**, 778–781.

- Millner, P.D., Bassett, D.A. and Marsh, P.B. (1980) Dispersal of *Aspergillus fumigatus* from sewage sludge compost piles subjected to mechanical agitation in open air. *Appl Environ Microbiol* **39**, 1000–1009.
- Neef, A., Witzemberger, R. and Kampfer, P. (1999) Detection of sphingomonads and in situ identification in activated sludge using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *J Ind Microbiol Biotechnol* **23**, 261–267.
- Neef, A., Schäfer, R., Beimfohr, C. and Kämpfer, P. (2003) Fluorescence based rRNA sensor systems for detection of whole cells of *Saccharomonospora spp.* and *Thermoactinomyces spp.* *Biosens Bioelectron* **18**, 565–569.
- Nielsen, E.M., Nielsen, B.H. and Breum, N.O. (1995) Occupational bioaerosol exposure during collection of household waste. *Ann Agric Environ Med* **2**, 53–59.
- Nielsen, B.H., Würtz, H., Breum, N.O. and Poulsen, O.M. (1997) Microorganisms and endotoxin in experimentally generated bioaerosols from composting household waste. *Ann Agric Environ Med* **4**, 159–168.
- Peccia, J. and Hernandez, M. (2006) Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: a review. *Atmos Environ* **40**, 3941.
- Poulsen, O.M., Breum, N.O., Ebbehoj, N., Hansen, A.M., Ivens, U.I., Van Lelieveld, D., Malmros, P., Matthiasen, L. *et al.* (1995) Sorting and recycling of domestic waste: review of occupational health problems and their possible causes. *Sci Total Environ* **198**, 33–56.
- Rappé, M.S. and Giovannoni, S.J. (2003) The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* **57**, 369–394.
- Ravenschlag, K., Sahm, K., Perntaler, J. and Amann, R. (1999) High bacterial diversity in permanently cold marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3982–3989.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J., Insam, H. and Swings, J. (2003) A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Ann Microbiol* **53**, 349–410.
- Sánchez-Monedero, M.A. and Stentiford, E.I. (2003) Generation and dispersion of airborne microorganisms from composting facilities. *Trans IChemE* **81**, 166–170.
- Sanchez-Monedero, M.A., Stentiford, E.I. and Urpilainen, S.T. (2005) Bioaerosol generation at large-scale green waste composting plants. *J Air Waste Manag Assoc* **55**, 612–618.
- Schloss, P.D. and Handelsman, J. (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1501–1506.
- Shen, D.K., Noodeh, A.D., Kazemi, A., Grillot, R., Robson, G. and Brugere, J.F. (2004) Characterisation and expression of phospholipases B from the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* **239**, 87–93.
- Song, J., Weon, H.Y., Yoon, S.H., Park, D.S., Go, S.J. and Suh, J.W. (2001) Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and *Thermoactinomyces spp.* isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol Lett* **202**, 97–102.
- Steger, K., Sjogren, A.M., Jarvis, A., Jansson, J.K. and Sundh, I. (2007) Development of compost maturity and *Actinobacteria* populations during full-scale composting of organic household waste. *J Appl Microbiol* **103**, 487–498.
- Stetzenbach, L.D. (1992) Airborne microorganisms. In *Encyclopedia of Microbiology* ed. Lederberg, J. pp. 53–65. London, UK: Academic Press.
- Stetzenbach, L.D. (2002) Introduction to aerobiology. In *Manual of Environmental Microbiology*, 2nd edn. ed. Hurst, C.J., Crawford, R.L., Knudsen, G.R., McInerney, M.J. and Stetzenbach, L.D. pp. 799–897. Washington, DC: ASM Press.
- Strom, P.F. (1985) Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting. *Appl Environ Microbiol* **50**, 906–913.
- Swan, J.R.M., Kelsey, A., Crook, B. and Gilbert, E.J. (2003) *Occupational and Environmental Exposure to Bioaerosols from Composts and Potential Health Effects – a Critical Review of Published Data*. Sudbury, UK: Health & Safety Executive.
- Sykes, P., Jones, K. and Wildsmith, J.D. (2007) Managing the potential public health risks from bioaerosol liberation at commercial composting sites in the UK: an analysis of the evidence base. *Resour Conserv Recycl* **52**, 410.
- Taha, M.P.M., Pollard, S.J.T., Sarkar, U. and Longhurst, P. (2005) Estimating fugitive bioaerosol releases from static compost windrows: feasibility of a portable wind tunnel approach. *Waste Manag* **25**, 445–450.
- Taha, M.P.M., Drew, G.H., Longhurst, P.J., Smith, R. and Pollard, S.J.T. (2006) Bioaerosol releases from compost facilities: Evaluating passive and active source terms at a green waste facility for improved risk assessments. *Atmos Environ* **40**, 1159–1169.
- Takaku, H., Kodaira, S., Kimoto, A., Nashimoto, M. and Takagi, M. (2006) Microbial communities in the garbage composting with rice hull as an amendment revealed by culture-dependent and -independent approaches. *J Biosci Bioeng* **101**, 42–50.
- Tang, J.C., Shibata, A., Zhou, Q. and Katayama, A. (2007) Effect of temperature on reaction rate and microbial community in composting of cattle manure with rice straw. *J Biosci Bioeng* **104**, 321–328.
- Tompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A. and Itävaara, M. (2000) Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresour Technol* **72**, 169–183.

- Van Tongeren, M., Van Amelsvoort, L. and Heederik, D. (1997) Exposure to organic dust, endotoxins and microorganisms in the municipal waste industry. *Int J Occup Environ Health* **3**, 30–36.
- Vaz-Moreira, I., Silva, M.E., Manaia, C.M. and Nunes, O.C. (2008) Diversity of bacterial isolates from commercial and homemade composts. *Microb Ecol* **55**, 714–722.
- Yu, H., Zeng, G., Huang, H., Xi, X., Wang, R., Huang, D., Huang, G. and Li, J. (2007) Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting. *Biodegradation* **18**, 793–802.
- Zhang, Y.C., Ronimus, R.S., Turner, N., Zhang, Y. and Morgan, H.W. (2002) Enumeration of thermophilic *Bacillus* species in composts and identification with a Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD) Protocol. *Syst Appl Microbiol* **25**, 618–626.
- Zhang, Y.X., Dong, C. and Biao, S. (2007) *Planifilum yunnanense* sp nov., a thermophilic thermoactinomycete isolated from a hot spring. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 1851–1854.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1 Phylogenetic positioning and sequences number for each bacterial phylotype. The table was ranked by decreasing number of sequences by phylotypes.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Développement d'indicateurs microbiens spécifiques afin de tracer les bioaérosols émis par les plates-formes de compostage en utilisant la PCRq

Article 2 : “Development of specific microbial indicators to trace airborne microorganisms emitted by composting platforms using qPCR”

Dans l'article précédant, la signature microbienne des bioaérosols émis lors du retournement d'andain en cours de fermentation a été identifiée. Elle est composée de dix phylotypes appartenant aux espèces et/ou groupes microbiens suivants : *Thermomyces lanuginosus*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* sp., *Geobacillus thermodenitrificans*, *Planifilum yunnanense*, *Thermoactinomyces intermedius*, *Thermoactinomycetaceae*, *Saccharopolyspora rectivirgula*, *Thermobifida fusca* et *Saccharomonospora glauca*.

L'objectif de cette seconde partie est de rechercher, au sein des micro-organismes, des indicateurs spécifiques permettant de mettre en évidence la présence de bioaérosols de compostage dans l'air.

Pour définir un indicateur, différents critères ont été établis :

- l'espèce doit être thermophile
- l'espèce doit déjà avoir été identifiée dans l'environnement "compost"
- l'espèce doit être présente dans les cinq bioaérosols précédemment analysés

Par ailleurs, la concentration de l'indicateur dans l'air doit augmenter lors de l'émission des bioaérosols sur les plates-formes de compostage, comparativement à un niveau "basal" qui doit être défini ("bruit de fond").

Dans un premier temps, trois phylotypes "candidats" ont été choisis parmi les dix constituant la signature microbienne des bioaérosols. Deux phylotypes répondent aux trois premiers critères énoncés, il s'agit du phylotype bactérien NA07 affilié à *Saccharopolyspora rectivirgula* et du phylotype fongique EQ05¹, proche de l'espèce *Thermomyces lanuginosus*. Un second phylotype bactérien, NC38, affilié à la famille des *Thermoactinomycetaceae* a été sélectionné du fait qu'il n'ait été identifié que dans l'environnement compost. Pour ces trois phylotypes, un système de quantification par PCR quantitative a été conçu en travaillant sur les séquences d'ADNr 16S ou ADNr 18S. Les trois systèmes développés sont spécifiques de leur cible.

Ces trois systèmes de PCRq ont été appliqués sur onze échantillons d'air provenant d'environnements naturels non soumis à l'influence d'une plate-forme de compostage. Ceci a permis de définir le niveau basal des indicateurs dans l'air (concentration du "bruit de fond").

Les indicateurs ont ensuite été quantifiés sur cinq plates-formes de compostage au voisinage d'une activité de retournement d'andain en phase de fermentation. Un premier échantillon d'air a été collecté en amont du site, avant toute activité tandis que le second prélèvement d'air a été réalisé à quelques dizaines de mètres en aval de la source émettrice (retournement d'andains).

Il en ressort que la concentration des trois indicateurs au sein des bioaérosols collectés lors du retournement est supérieure à celle du bruit de fond de l'air et également à celle mesurée en amont des plates-formes (différence de plus d'une unité logarithmique).

1. Phylotype nommé E014 dans l'article 1

Maintenant, trois indicateurs microbiens (deux bactériens et un fongique) spécifiques des bioaérosols de compostage émis lors du retournement d'andain en phase de fermentation ont été validés et des systèmes de PCRq ont été développés pour les quantifier.

Development of specific microbial indicators to trace airborne microorganisms emitted by composting platforms using qPCR

Olivier Le Goff, Jean-Philippe Steyer, Jean-Jacques Godon, Nathalie Wéry*

INRA, UR50, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, Narbonne F-11100

*Corresponding author. Mailing address : INRA, UR50, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, Narbonne, F-11100, France. Phone : 33 468 425 186. Fax : 33 468 425 160. E-mail : weryn@supagro.inra.fr

ABSTRACT

There is little data on the dispersal of composting bioaerosols partly due to the fact that specific microbial indicators are missing. The aim of this study was to identify microbial indicators specific to composting bioaerosols to trace them on and around composting plants. Three phylotypes, two bacterial (NA07 and NC38) and one fungal (EQ05) were selected. They belong to the core species of bioaerosols emitted during the turning of compost windrows in thermophilic phase. The TaqMan qPCR systems, specific to each indicator, were designed. The potential indicators were quantified in eleven air samples collected in various environment not impacted by a composting activity. These enabled to characterize the base level of the corresponding species air. The indicators were quantified on five composting platforms, in upwind, outside the site and in downwind during a turning activity. For the five composting plants studied, the concentration of the three indicators during the turning phase was always higher to the concentration measured in 'background' air and to the concentration measured upwind. These three microbial indicators can then be used to trace composting bioaerosols emitted on composting platforms.

Keywords : Bioaerosol, compost, indicators, qPCR

INTRODUCTION

Bioaerosols generated on composting platforms are emitted in the atmosphere during processes involving movement of the waste (waste delivery, shredding, compost pile turning and compost screening). These biological emissions (fungi, bacteria, actinomycetes, endotoxins and 1-3- β -glucans) from composting plants may have a potential impact on the health of workers and for the residents living in close proximity (Bünger et al., 2007, Bunge et al., 2000, Swan et al., 2003, Sykes et al., 2007). If the effects of exposure to composting bioaerosol on the respiratory health has been shown for the workers, the situation is not well documented for the residents (Bünger, et al., 2007, Herr et al., 2003, Porta et al., 2009). This is partly due to the fact that indicators of exposure to composting bioaerosols are missing. In the same way, the lack of specific composting bioaerosol markers makes dispersal studies difficult, since it is not possible to distinguish aerosols produced by composting activities from others sources of bioaerosol present around the site (Taha et al., 2005). Airborne microorganisms usually analysed in composting aerosols are cultivable bacteria or fungi, (mesophilic and/or thermophilic), or more specific microbial groups such as Gram negative bacteria, *Aspergillus fumigatus* and actinomycetes (Albrecht et al., 2007, Clark et al., 1983, Grisoli et al., 2009, Hryhorczuk et al., 2001, Kampfer et al., 2002, Millner et al., 1980, Nikaeen et al., 2009, Sánchez-Monedero and Stentiford, 2003). These microbial groups are not specific to compost aerosol and are widespread in the environment. Furthermore, most studies on composting bioaerosols were performed using cultural methods for quantifying microorganisms. However, the cultivability of bacteria is generally low in the environment (0.001 to 10%) and in the air, the cultivable fraction of microorganisms represents less than 1% of the total number of cells (Amann et al., 1995, Peccia and Hernandez, 2006). Culture methods therefore largely underestimate the number of microorganisms present in air samples.

The objective of the study was the identify microbial groups specific to compost bioaerosols and to design systems, in order to trace airborne microorganisms emitted by composting platforms. Molecular techniques based on DNA analysis enable the quantification of non cultivable bacteria. In particular, quantitative real-time PCR is sensitive, rapid and has been applied for the enumeration of microorganisms in various environmental matrices, including air (Stetzenbach et al., 2004).

The identification of potential indicators of compost bioaerosols was based on the analysis of the microbial diversity in composting bioaerosols collected on five industrial sites by molecular inventory based on the SSU ribosomal DNA fragments (Le Goff et al., 2010). This study has shown the presence of bacterial and fungal core species common to the five bioaerosols that could represent indicators of composting bioaerosols in air.

Several criteria were considered to define an indicator of composting bioaerosol. The species : a) should be thermophilic, since thermophilic species multiply during the composting process but are not thought to occur naturally at high concentration in air, b)

should be present at least in four of the five molecular inventories, c) should have microbial relatives already identified in compost in previous studies, d) should be specific (the indicator should be present at a higher concentration in air during composting activities than in 'natural' environments not impacted by a compost activity). Three thermophilic phylotypes were identified among the core species of composting aerosols emitted during the turning of compost windrow in the thermophilic phase. They meet the first four criteria defined above. This paper presents the design of quantitative real-time PCR systems for these phylotypes. The relevancy of the three potential indicators of composting bioaerosols was then tested by comparing their concentration on composting sites during one emitting operational activity (the turning of composting piles), with the concentration in upwind control samples and with the 'background concentration' observed in natural environments.

MATERIALS AND METHODS

Air sampling

Five composting platforms, all operating in open windrows, were studied. For each plant, two bioaerosols samples were collected, the first one was located outside the composting platforms at an upwind location, with no specific emitting activity on site. The second was collected on the platform, downwind of one emitting activity, i.e. during the turning of compost piles in the thermophilic phase. The table 6.1 presents the characteristics of each compost pile, the distance to the emission source (turning) and the meteorological conditions during the sampling.

Eleven bioaerosol samples were collected in different natural environments, not impacted by any composting activity. All air samples were collected using the biocollector Coriolis[®] μ (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) at a flow rate of 300 L min⁻¹, for time period going from 30 minutes (downwind samples on composting plants) to more than one hour (other samples). For low concentration level, several collection liquids of 30 minutes were pooled together. The biological particles were collected into a sterile solution of 0.005% Tween 20 (Sigma, St Louis, MO, USA) in milliQ water contained in a cone. The sample collected was then filtered at 0.2 μ m on polyethersulfone filter (Supor, 2000, Pall Corporation, Ann Arbor, MI, USA). Each filter was kept frozen at -80°C in a 2 mL tube until DNA extraction. DNA extraction was performed as previously described by Le Goff *et al.* (Le Goff, et al., 2010).

TABLEAU 6.1 – Characteristics of compost windrows and meteorological conditions air sampling

Site	Sample	Waste	Compost age (weeks)	Compost temperature (°C)	Distance to the emission source (m)	Meteorological conditions		
						Wind (m s ⁻¹)	Temperature (°C)	Moisture (%)
A	Upwind	Green waste	8	50	175	1	21	60
	Downwind					2	26	57
B	Upwind	Municipal solid waste	1-10 ¹	44-69	50	1	18	100
	Downwind					4	21	72
C	Upwind	Green waste and sludge	3	60	40	3	20	78
	Downwind					1	25	61
D	Upwind	Green waste, Biowaste ³	6	55	80	2	2	100
	Downwind					4	6	100
E	Upwind	Green waste and sludge	6	60	100	1	18	100
	Downwind					3	23	80

¹ Several compost windrows were turned

² The distance increased because the windrow turning machine was moving on the windrow

³ Industrial biowaste, manure, mycelium, fats, waste from domestic industries

Design of quantitative real-time PCR primers and probes

Three quantitative real-time PCR systems were developed based on partial sequences of SSU ribosomal DNA (16S rDNA and 18S rDNA) for two bacterial phylotypes, NA07 and NC38 belonging respectively to *Saccharopolyspora* and to the *Thermoactinomycetales*, and for one fungal phylotype, EQ05, related to *Thermomyces* sp.. All primers and TaqMan probes were designed by combining different programs : ARB software (Ludwig et al., 2004) using the Probe design tool and the Probe Match tool, Primer3plus (Untergasser et al., 2007), Perl Primer (Marshall et al., 2003) and NCBI Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). The melting temperature (T_m) was fixed to 60°C for the primers and 70°C for the probe. The design was realized according to general guidelines for qPCR primers and probes design (melting temperature, G/C content) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

For one qPCR system (NA07), the probe was modified to a TaqMan MGB probe. Dimers of primers were checked for each primers pairs and also for each primer with the probe using the software PrimerExpress (Applied Biosystems).

Table 6.2 indicates the sequences of the primers and the probes, the fluorophores used and the amplicon size for the three quantitative real-time PCR systems. The primers and the TaqMan probes W269 and W272 were synthesized by Eurogentec (Liege, Belgium), the MGB probe W253 by Applied Biosystems.

Validation in silico of the specificity of the three quantitative real-time PCR systems

In a first step, the primer pair and the probe were designed to amplify the target sequence at zero mismatch. Then the specificity of the whole system was checked by looking at non specific sequences amplified at 0, 1, 2 and 3 mismatches.

The specificity of each qPCR system was checked on public databases (NCBI) using the ARB software, the BLASTn algorithm (Altschul et al., 1990), and Primer Blast.

The sequences which were 100% identical with the probes and the primers were positioned in the phylogenetic trees. The 16S rDNA or 18S rDNA sequences were edited in the BioEdit version 7.0.9.0 program (Hall, 1999) and aligned by the MUSCLE program (Edgar, 2004). The three phylogenetic trees were then constructed by the SEAVIEW version 4 program (Gouy et al., 2010) with the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) and Jukes-Cantor correction. The robustness was tested by 1,000 replications and the bootstrap over 50% was indicated at nodes for each tree.

TABLEAU 6.2 – Quantitative real-time PCR systems

Name	Primers/probes	Sequences	Position ¹	Amplicon size	Concentration in nM
NA07					
W246	Forward	5'-TGCAAGTCGAACGCTGAAGC-3'	F56-75		200
W248	Reverse	5'-TGCGGCAGAAATGTCCATATCC-3',	R189-169	141 bp	200
W253	MGB probe	5'-6FAM-ATCCACCCACCACAA-NFQ-3'	R99-83		100
NC38					
W267	Forward	5'-CTGCAAGACCCGGGATAACTGC-3'	F136-156		150
W268	Reverse	5'-CCCATCTGCAAGTGACGACT-3',	R232-211	110 bp	150
W269	Probe	5'-6FAM-CCGGAGCTAATACCGGATAAGAGGCTTTTC-TAMRA-3'	F163-192		100
EQ05					
W270	Forward	5'-AATTGCGATAACGAACGAGACC-3'	F1092-1114		150
W271	Reverse	5'-GAGCCGATAGTCCCCCTAAGA-3'	R1168-1147	78 bp	150
W272	Probe	5'-6FAM-CCTTAAATAGCCCCGCCGCTTTT-TAMRA-3'	F1119-1143		100

¹Corresponding position in *Escherichia coli* 16S rDNA gene
6-FAM (Carboxyfluorescein); NFQ (Non Fluorescent Quencher); TAMRA (Tetramethyl-6-Carboxyrhodamine)

qPCR conditions

For each qPCR system, the optimal annealing temperature and the optimal concentrations of primers was determined. The absence of dimer of primers was checked by qPCR using detection by Sybrgreen. The reaction mixture was performed in a volume of 25 μL containing 5 μL of DNA and 12.5 μL of Master Mix 2X (containing SYBR Green I Dye, AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase, dNTPs, reference (rox), and optimized buffer components) (Applied Biosystems) and primers and the rest in of sterile water. The qPCR were performed in an ABI700 (Applied Biosystems). The conditions of quantitative real-time PCR amplification were an initial step at 95°C for 10 min, 40 cycles at 95°C for 15s and 60°C for 1 min and finally a dissociation stage (15s at 95°C, 20s at 60°C and 15s at 95°C).

The optimal concentrations of primers are given in table 6.2. The concentration of the probe was fixed to 100nM for all the three qPCR systems. The qPCR program was the following : 95°C for 10 min and 40 cycles at 95°C for 15s and 60°C for 1 min. The quantitative PCR reaction contained 12.5 μL of qPCR Master Mix Plus (2X, including buffer, dNTPs, HotGoldStar DNA polymerase, MgCl₂ (5mM final concentration) and the passive reference (rox)) (Eurogentec), primers at their optimal concentration, 100nM of probe and 5 μL of DNA. The total volume was 25 μL . Negative controls (no DNA added) were performed. All qPCR assays were performed an ABI Prism 7000 Sequence Detection System version 1.2 (Applied Biosystems) or in triplicates (the samples collected on composting plants) or in duplicates (other samples).

In order to detect PCR inhibition, an internal positive control (IPC) was used according to the manufacturer's instructions (Eurogentec, Liege, Belgium). The IPC control was detected using a Yakima-Yellow[®] (Eurogentec) labeled probe and the target template using a FAM-labeled probe. The reaction mixture was the following : 25 μL of qPCR Master Mix (2X) (Eurogentec), 1 μL of IPC mix, 0.5 μL of IPC DNA, primers at their optimal concentration, the probe at 100nM, sterile water and 5 μL of DNA sample, in a total volume of 50 μL . The program was the same as described above.

Alternatively, three different dilutions of each DNA sample were amplified and the initial calculated concentrations were compared in pairs. Inhibited PCR reactions produced lower values which were eliminated from the analyze. For concentrated samples enabling different levels of dilution, this second approach was chosen to test for the presence of inhibitors. For samples containing a small number of target genes, the IPC was used. One standard curve was generated at each assay. The standard curves were obtained by amplifying serial 10 fold dilutions of plasmid containing the DNA target sequence (10^7 to 10^0 rDNA copies μL^{-1}). The concentration of the concentrated plasmid solution was measured by the Nanoquant (Infinite M200, Tecan, Austria). Each standard was tested in triplicate.

For each qPCR system, the limit of quantification was defined in two steps. The limit of quantification for the standards corresponded to the lowest concentration of standard at which 95% of the PCR were positive. The limit of quantification for the NA07 system

was 1 copy of 16S rDNA m⁻³, for NC38 system 10 copies of 16S rDNA m⁻³ and for EQ05 system 100 copies of 18S rDNA m⁻³. For each sample, the limit of quantification was determined considering the limit of quantification defined for each qPCR systems at the lowest positive dilution of the DNA extract. This limit was expressed in number of copy of rDNA by cubic meter of collected air.

Data analysis

The qPCR efficiency (E) of each assay was calculated using the following formula $E = (-1 + 10^{-1/slope}) * 100$, where the slope was obtained by the regression analysis between the threshold cycle (Ct) and the logarithm number of copies of 16S or 18S rDNA (standard curves) (a slope of 3.32 translates into 100% of efficiency). The qPCR efficiency for the NA07 and NC38 quantification systems were included between 96 and 100% with a correlation coefficient always superior at 0.96. For the EQ05 quantification system, E varied between 77 and 80% and the correlation coefficient was always above 0.99. Concerning the negative controls, no signal was detected after 40 cycles for the three qPCR systems. Arithmetic means and standard deviation were calculated using values from qPCR replicates. The number of 16S rDNA or 18S rDNA copies per cubic meter was estimated for each sample.

RESULTS

Selection of microbial indicators of composting bioaerosols

In a previous study, the comparison of the microbial diversity in composting bioaerosols collected on five different platforms during a turning activity (compost piles in the thermophilic phase) enabled the identification of the core species of composting bioaerosol (Le Goff, et al., 2010). Among those core species, three (two bacterial and one fungal) were selected as potential indicators of composting bioaerosols based on the following criteria : a) present in the five molecular inventories, b) thermophilic, c) closest SSU ribosomal DNA sequence previously found in compost biotope and d) dominant in the bioaerosol.

The two bacterial sequences (NA07 (FJ754764) and NC38 (FJ754691) clones) belong to thermophilic groups previously identified in compost : *Saccharopolyspora*, a thermophilic *Actinobacteria* (Steger et al., 2007) and the *Thermoactinomycetaceae* (Partanen et al., 2010, Yamada et al., 2008). The fungal sequence (EQ05 clone (HM581687)) was related to *Thermomyces lanuginosus*, also known as present in compost (Singh et al., 2003). The table 6.3 indicates the abundancy of each indicator in air samples collected on the five composting plants. The abundancy was calculated based on the percentage of the sequence obtained in molecular inventories (rDNA subunit analysis). NA07 sequence was found in the five sites and represented 7% of the total number of 16S rDNA sequences. For two sites, its abundancy was above 10%. NC38 sequence was found in four sites and represented 2% of the total number of 16S rDNA sequences. The highest abundancy of

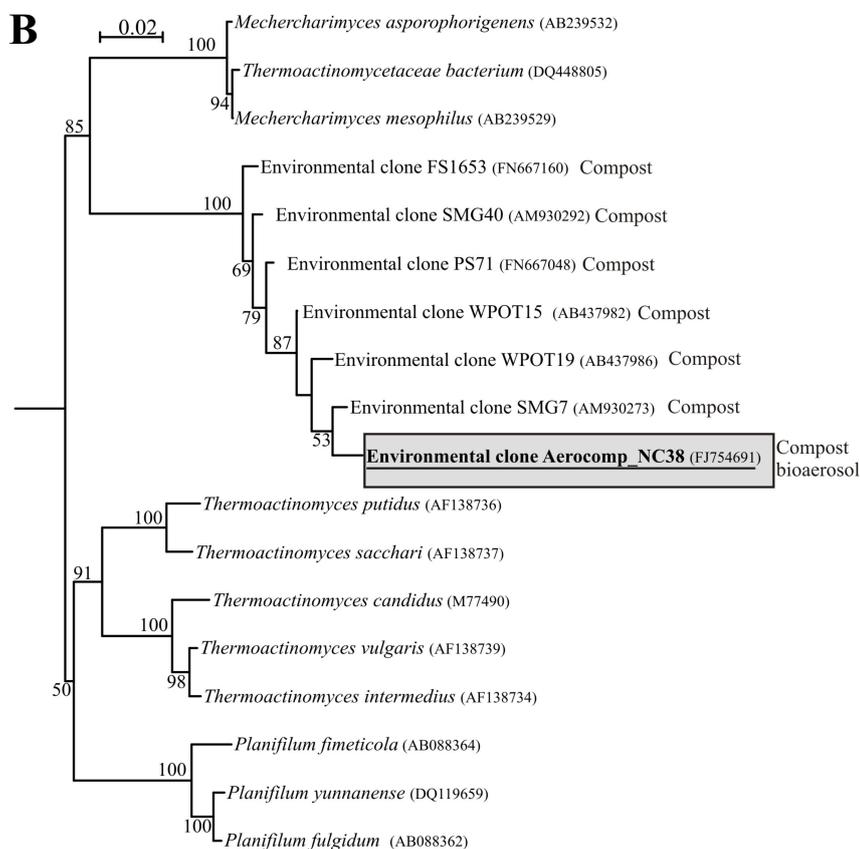
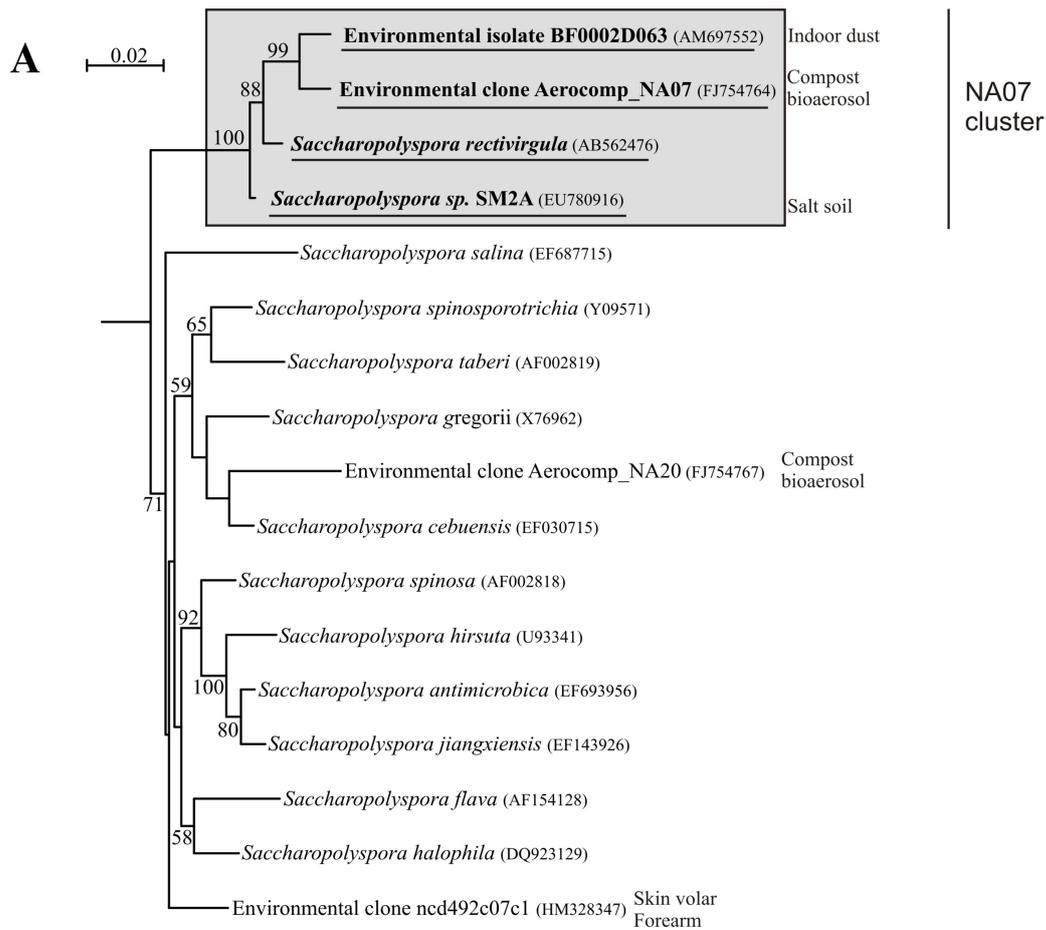
NC38 observed was of 5%. EQ05 sequence was identified in the five sites and highly abundant in bioaerosol, since it represented 49% of the total number of 18S rDNA sequences. However in the site A, its abundancy was much lower (5%). This site was dominated by two genera *Penicillium* and *Aspergillus*.

TABLEAU 6.3 – Abundancy of the three indicators based on the number of sequences in SSU ribosomal molecular inventories in bioaerosols collected on five industrial composting sites during the turning of windrows in thermophilic phase

	Total number of sequences	Abundancy of the phylotype (% of total sequences)		
		Bacteria		Fungi
		Bacteria / Fungi	NA07	NC38
Site A	111 / 20	19	0	5
Site B	127 / 30	14	1	77
Site C	158 / 13	1	3	54
Site D	143 / 23	3	5	39
Site E	146 / 36	1	1	56
Total	685 / 122	7	2	49

Design of quantitative real-time PCR detection systems

For each potential indicator, qPCR systems based on TaqMan technology were designed (two primers and one probe). The specificity of each system was then tested in silico. The figure 6.1 indicates the phylogenetic positioning of clones NA07, NC38 and EQ05 and their closest SSU sequences in public databases sequences amplified with the primers (underlined sequences), with the probe (in bold) and with the whole qPCR system (in box) at zero mismatch.



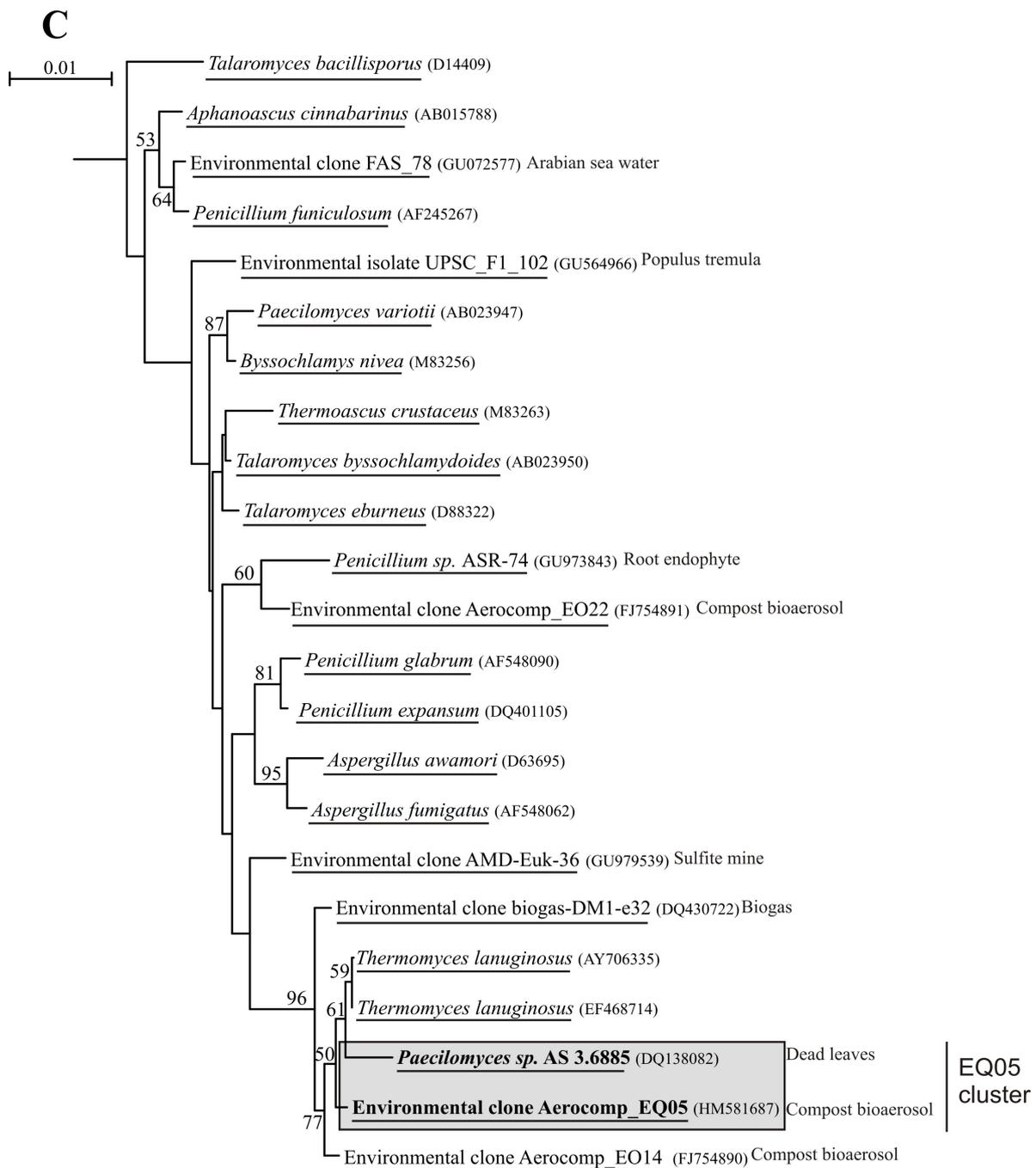


FIGURE 6.1 – Phylogenetic positioning of NA07 (A), NC38 (B) and EQ05 (C) based on partial 16S rDNA and 18S rDNA sequences. Bootstrap values over 50% are indicated at nodes. The sequences used to out-group were the 16S rDNA sequence of *Escherichia coli* strain K12 (U00096) for the bacteria and the 18S rDNA sequence of *Saccharomyces cerevisiae* (Z75578) for the fungi. The sequences underlined represented the sequences which are amplified by the primer pairs at zero mismatch. The sequences in bold are the sequences that match by the probe at zero mismatch. The box indicates the sequences amplified by the whole qPCR system.

'NA07' qPCR system (*Saccharopolyspora* sp.)

The forward primer amplified around 300 sequences belonging to the phylum *Actinobacteria* at zero mismatch whereas the reverse primer only amplified sequences affiliated to *Saccharopolyspora rectivirgula*, *Saccharopolyspora cebuensis* and the NA07 sequence. At zero mismatch, the probe hybridized only the phylotype NA07 and the sequences affiliated to *Saccharopolyspora* sp.. No sequences matched at one mismatch on the probe, and the first non specific sequences were obtained at two mismatches on the probe sequence. Overall, the qPCR 'NA07' system was very specific and amplified a cluster belonging to *Saccharopolyspora* (*Actinobacteria*) that gathered only four sequences : the Aerocomp_NA07 sequence (Le Goff, et al., 2010), one sequence isolated from indoor dust (Rintala et al., 2008), a sequence affiliated to *Saccharopolyspora rectivirgula* obtained from compost and a sequence affiliated to *Saccharopolyspora* sp. SM2A isolated from salty soil (figure 6.1A).

'NC38' qPCR system (*Thermoactinomycetaceae*)

The qPCR 'NC38' system was designed to amplify only the 16S rDNA sequence of the clone Aerocomp_NC38. Indeed at zero mismatch, the probe and each primer amplified only the target sequence of NC38. With one mismatch, the forward primer hybridizes six sequences associated to the phylum *Firmicutes*. The reverse primer amplified non specific sequences only at two mismatches. The NC38 phylotype belongs to the *Thermoactinomycetaceae* family but was not affiliated closely to a previously described species. It may therefore correspond to a new bacterial species (80% of 16S rDNA similarity with the closest sequences in public database). Its strong association with the compost biotope is demonstrated by the fact that the closest 16S rDNA sequences present in the public databases were also recovered from composts (Guo et al., unpublished, Partanen, et al., 2010, Yamada, et al., 2008) (figure 6.1B).

In the study of Partanen *et al.*, sequences were recovered from compost of treated municipal wastes during the thermophilic phase, whereas in the study of Yamada *et al.*, the compost was produced from cow dung and sawdust, and the analysis performed during the maturing phase.

'EQ05' qPCR system (*Thermomyces*)

The specificity of the qPCR system was brought by the probe. The primers amplifying other sequences (*Aspergillus*, *Penicillium*...). The 'EQ05' qPCR system, amplified two sequences at zero mismatch : EQ05 sequence and a sequence affiliated to *Paecilomyces* sp. AS.3.6885 and identified on dead leaves (figure 6.1C). The degradation of leaves in aerobic condition could involve the same microorganisms as a composting process.

Quantification in the natural environments ('Background concentration')

An indicator of composting aerosol should present a higher concentration on composting platforms than in natural environments. In a first step, the potential indicators were quantified in eleven air samples collected in various natural environments (marine, rural. . .) to

define their 'background' concentration in air. The NA07 target was quantified in seven of the eleven environments tested (figure 6.2). For the remaining samples, the concentration was below the quantification limit. The background concentration of 'NA07' in air varied from 10^2 to 10^4 copies of 16S rDNA m^{-3} . The second bacterial indicator, NC38, was detected in only two environments (open woodland and garden) (figure 6.3). The concentration were 4×10^2 (garden) and 4×10^3 (woodland) copies of 16S rDNA m^{-3} . The fungal indicator was detected in half of the natural environments tested and its concentration varied from 2×10^4 to 7×10^5 copies of 18S rDNA m^{-3} (figure 6.4).

Quantification on composting plants

Five composting plants were studied, the distance to the compost windrows and the meteorological conditions are given in table 1. Bioaerosols were collected during the turning of compost piles in thermophilic phase at downwind location. An upwind sample, located outside the composting plant, was collected as control.

During the turning activity, all three qPCR systems were quantified downwind (figures 6.2, 6.3 and 6.4). The concentration ranges for 'NA07' and 'NC38' were 2×10^6 to 4×10^7 copies of 16S rDNA m^{-3} and 9×10^3 to 8×10^5 copies of 16S rDNA m^{-3} respectively. The concentration of the 'EQ05' varied from 5×10^6 to 1×10^7 copies of 18S rDNA m^{-3} .

The concentration for 'NA07' was determined in all upwind samples composting plants (figure 6.2). It ranged between 5×10^2 and 3×10^3 copies of 16S rDNA m^{-3} . For the 'NC38', the concentration range was similar to the one of 'NA07' : 7×10^2 to 1×10^3 copies of 16S rDNA m^{-3} (figure 6.3). The 'EQ05', was not detected in the upwind samples (figure 6.4).

The concentration of all three indicators outside the composting plants in the upwind samples was always inferior to the concentration measured downwind during the turning activities. An increase of 2 to 5 orders of magnitude (4 in average) was observed between the upwind and the downwind samples for 'NA07' and 2 to 4 orders of magnitude for NC38. The increase of 'EQ05' was above 2 logarithmic units, since it was not detected in the upwind samples. The high increase of the concentrations means that the turning activity on the composting plants induced an important emission of the three microbial indicators in air.

The concentrations downwind were also above those observed in natural environments. The difference was included between 2 and 5 orders of magnitude for 'NA07', between 1 and 3 orders of magnitude for NC38 and between 1 and 4 orders of magnitude for 'EQ05'.

For the two bacterial indicators, the concentrations observed in upwind samples were in the range of those obtained in natural environments, with an average concentration of 2×10^3 copies of 16S rDNA m^{-3} . The fungal indicator concentration was frequently below the quantification limit (all upwind samples and five of the eleven natural environments).

Overall, activities of compost turning on industrial composting platforms induce an increase of the concentration of the three indicators of at least two orders of magnitude, compared to concentration measured in upwind and of at least one order of magnitude

Développement d'indicateurs microbiens spécifiques afin de tracer les bioaérosols émis par les plates-formes de compostage en utilisant la PCRq

compared to the 'background' concentration measured in natural environments not impacted by industrial activities.

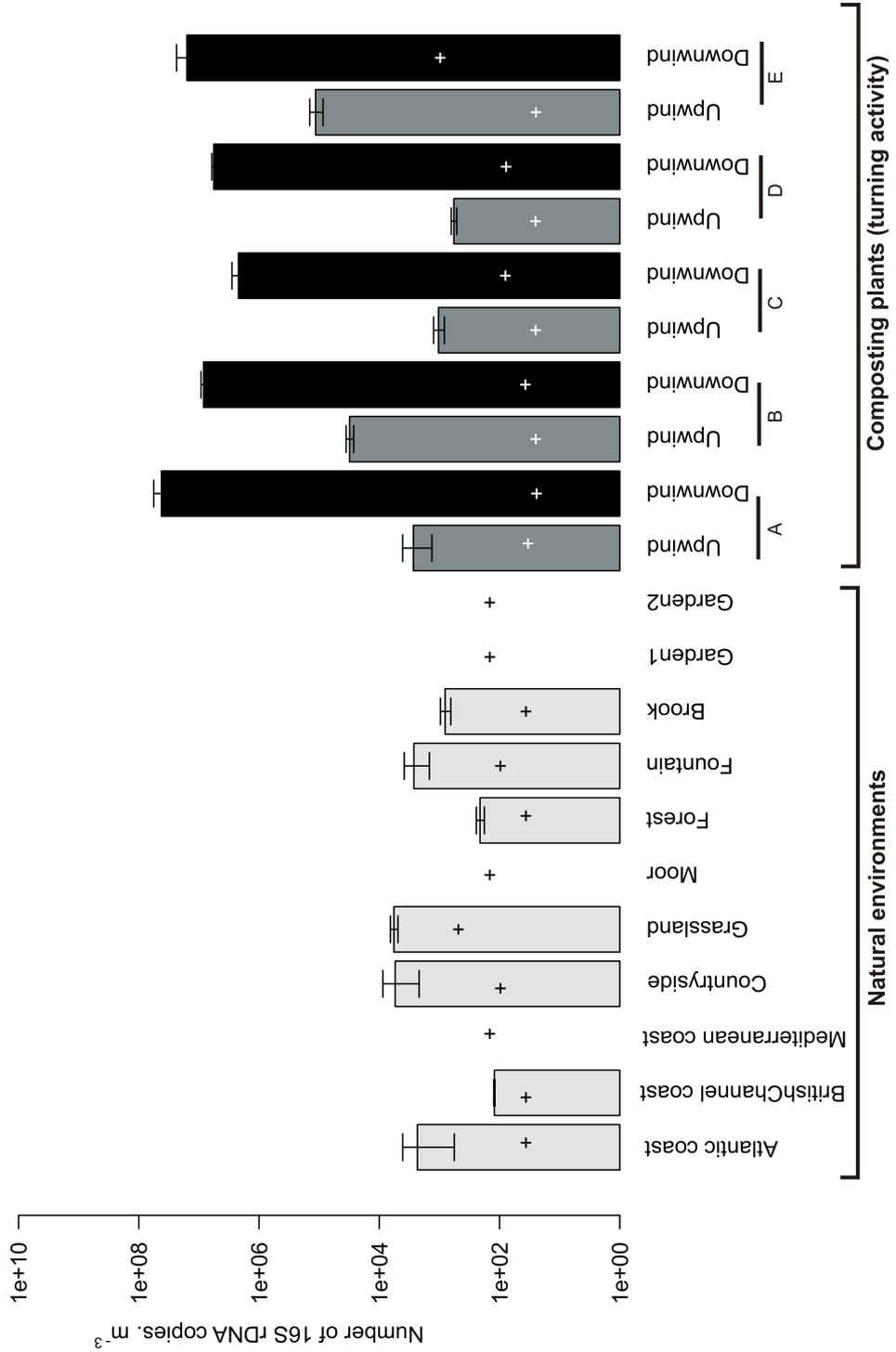


FIGURE 6.2 – Concentration of NA07 in air samples collected in natural environments and on five composting platforms during the turning of composting piles in thermophilic phase (upwind and downwind of the turning activity). Crosses indicate the limit of quantification for each sample.

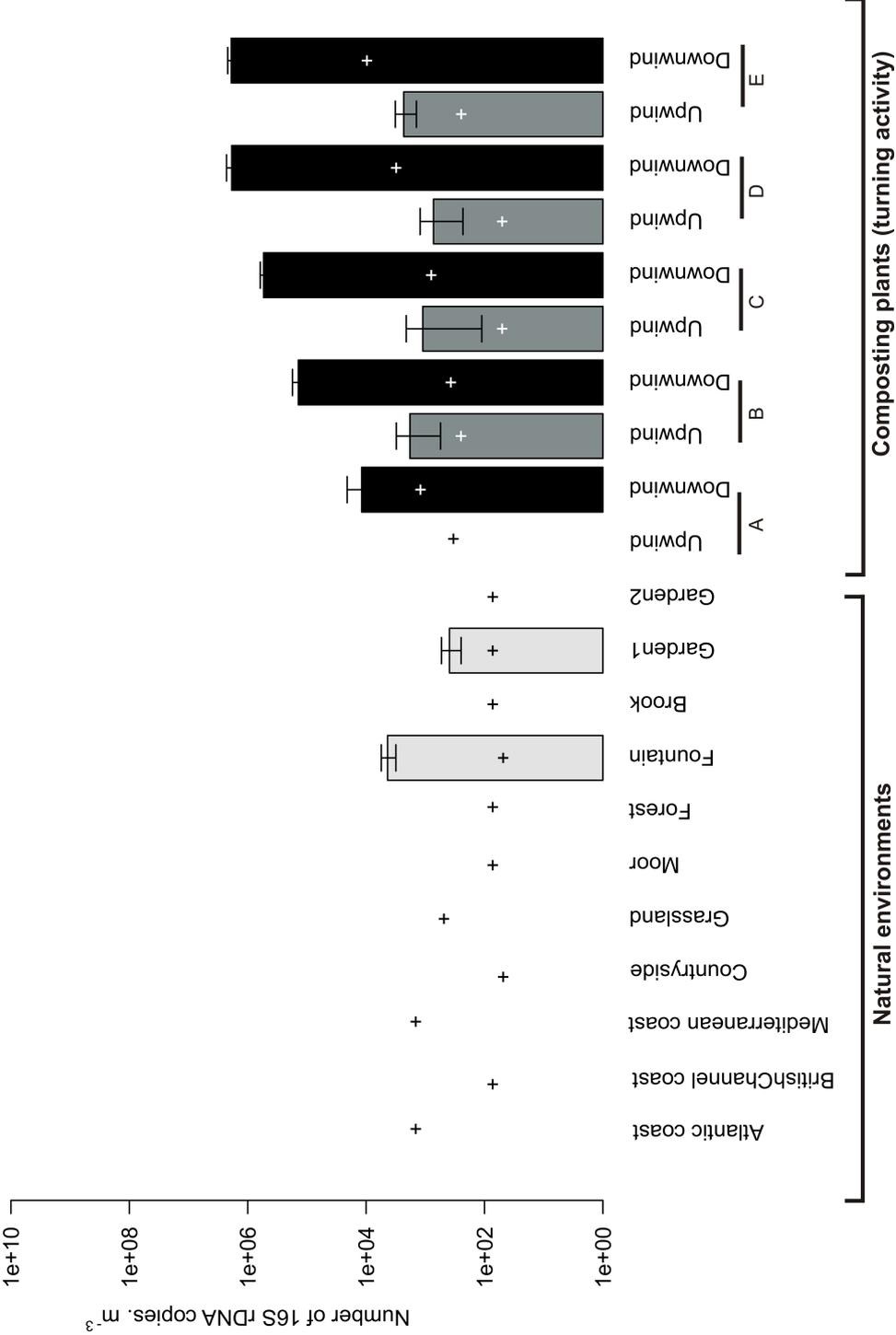


FIGURE 6.3 – Concentration of NC38 in air samples collected in natural environments and on five composting platforms during the turning of composting piles in thermophilic phase (upwind and downwind of the turning activity). Crosses indicate the limit of quantification for each sample.

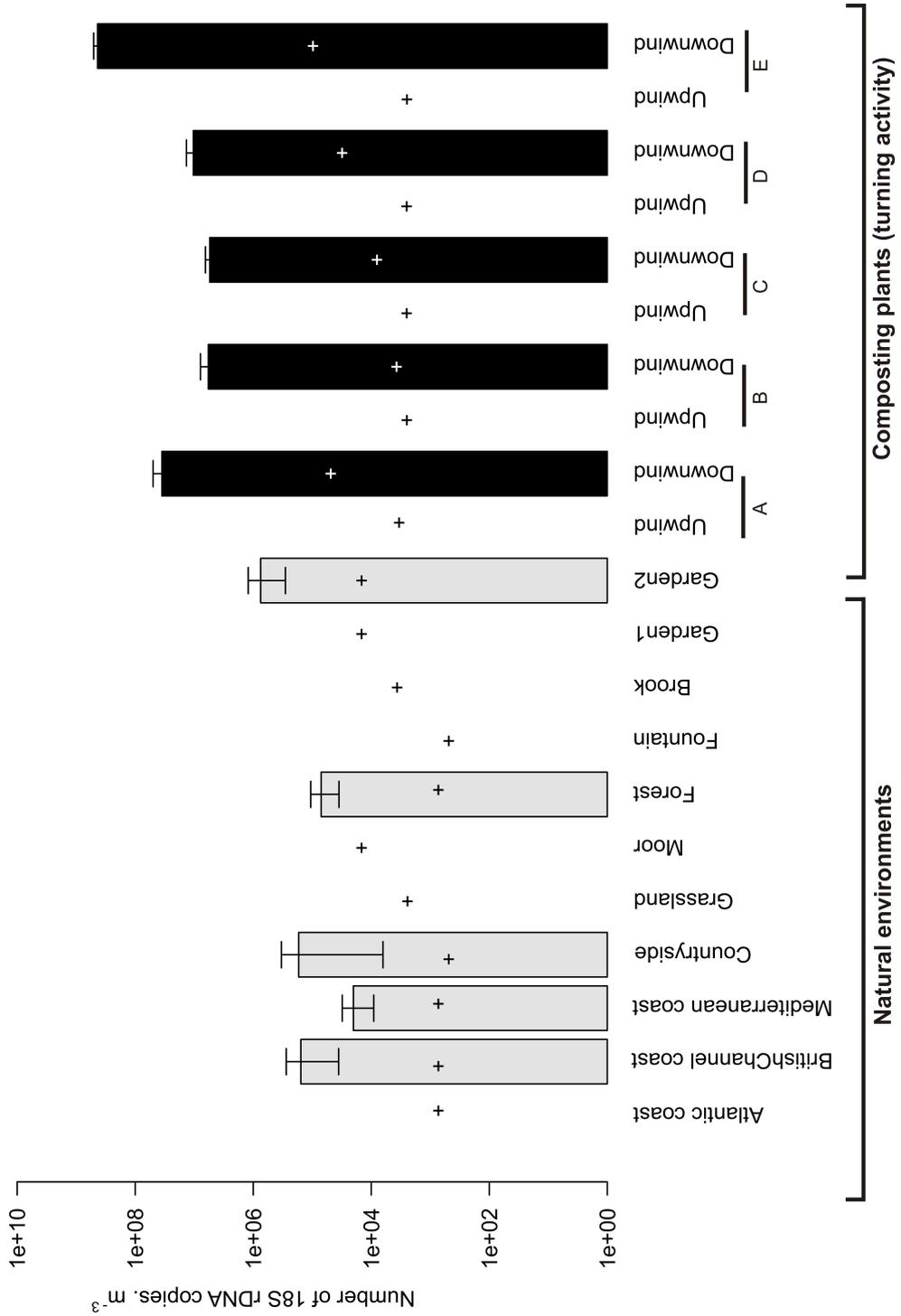


FIGURE 6.4 – Concentration of EQ05 in air samples collected in natural environments and on five composting platforms during the turning of composting piles in thermophilic phase (upwind and downwind of the turning activity). Crosses indicate the limit of quantification for each sample.

DISCUSSION

In this study, the potential of three microbial phylotypes to be used as indicators of compost bioaerosol was tested. These three phylotypes belonged to core species of bioaerosols emitted during the turning of compost piles in the thermophilic phase (Le Goff, et al., 2010). Phylogenetic analysis showed that these different indicators belong to microbial groups previously described in compost (Anastasi et al., 2005, Partanen, et al., 2010, Ryckeboer et al., 2003, Strom, 1985, Tuomela et al., 2000, Yamada, et al., 2008).

A quantitative PCR system was designed for each of the three potentials indicators. Despite the fact that 18S rDNA sequences are highly conserved among fungi, it was possible to design a specific qPCR system for the EQ05 cluster. As observed for other fungal qPCR systems, the specificity was given by the probe (Wu et al., 2003). The three indicators were always quantified in the bioaerosols emitted during the turning of composting windrows. The NC38 indicator was detected during the turning for the site A, although it was absent from the molecular inventory (table 6.3). However, molecular inventories on a small number of sequences (100 to 150) give mainly the information of relative abundance between dominant species.

The fact that fungal spores emission depends on various factors (days/night, meteorological conditions...) might explain the variability observed for 'EQ05' concentration in natural environments (Li and Kendrick, 1994, Stepalska and Wolek, 2009). The species affiliated to the phylum *Ascomycota* and *Basidiomycota* were preferentially emitted spores during the night and/or after the rain (Brown, 1997, Herrero et al., 2006, Li and Kendrick, 1994).

The use of the three microbial groups studied as indicators of composting bioaerosols, was validated by the fact that the concentration during the compost turning was higher than the background concentration observed in natural environment not impacted by an industrial composting activity.

The average difference between downwind and background concentration was however smaller for the fungal cluster EQ05 than for bacterial ones. The bacterial indicators may therefore be more interesting than the fungal indicator to trace compost bioaerosols emitted on industrial platforms.

The use of thermophilic microorganisms (actinomycetes, such as *Saccharomonospora* sp., *Thermoactinomyces* and thermophilic fungi) to trace airborne microorganisms emitted by composting platforms was previously reported (Kampfer, et al., 2002, Neef et al., 2003). *Aspergillus fumigatus* was also used to characterize levels of emission from composting plants (Albrecht et al., 2008). However, this study is the first one validating the core of thermophilic microbial groups as composting bioaerosols indicators by developing qPCR systems highly specific to targets, shown as belonging to 'core species' of compost bioaerosols and by comparing the level in compost on industrial plants to the the background environmental levels. Furthermore, combining three qPCR systems will enable an

accurate measurement of compost bioaerosols in air samples.

As a conclusion, three microbial indicators, one affiliated to *Saccharopolyspora rectivirgula*, one to *Thermomyces* and one belonging to the *Thermoactinomycetaceae*, were demonstrated as able to sign composting bioaerosols emitted during turning activities on composting plants. These indicators could be used for bioaerosol air dispersal studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

We were grateful to Veolia propreté, Veolia environnement reseach and innovation and to employees at the different composting sites for their help during the sampling campaigns. This work was supported financially by the Languedoc-Roussillon Regional Government Council (France) and the French Agency for Environmental and Energy Management (ADEME) (ADEME, Contrat n°.0375C0033).

REFERENCES

- Albrecht, A., Fischer, G., Brunnemann-Stubbe, G., Jäckel, U., Kämpfer, P., 2008. Recommendations for study design and sampling strategies for airborne microorganisms, MVOC and odours in the surrounding of composting facilities. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 211, 121-131.
- Albrecht, A., Witzemberger, R., Bernzen, U., Jackel, U., 2007. Detection of airborne microbes in a composting facility by cultivation based and cultivation-independent methods. *Ann Agric Environ Med.* 14, 81-85.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
- Anastasi, A., Varese, G.C., Marchisio, V.F., 2005. Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. *Mycologia.* 97, 33-44.
- Brown, J.F., 1997. Airborne inoculum. In : J. F. Brown, H. J. Ogle (Eds.), *Plant Pathogens and Plant Diseases*
- Bünger, J., Schappler-Scheele, B., Hilgers, R., Hallier, E., 2007. A 5-year follow-up study on respiratory disorders and lung function in workers exposed to organic dust from composting plants. *Int Arch Occup Environ Health.* 80, 306-312.
- Bunger, J., Antlauf-Lammers, M., Schulz, T.G., Westphal, G.A., Muller, M.M., Ruhnau, P., Hallier, E., 2000. Health complaints and immunological markers of exposure to bioaerosols among biowaste collectors and compost workers. *Occupational and Environmental Medicine.* 57, 458-464.
- Clark, C.S., Rylander, R., Larsson, L., 1983. Levels of gram-negative bacteria, *Aspergillus fumigatus*, dust, and endotoxin at compost plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1501-1505.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE : multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl. Acids Res.* 32, 1792-1797.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView Version 4 : A Multiplatform Gra-

- phical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Mol Biol Evol.* 27, 221-224.
- Grisoli, P., Rodolfi, M., Villani, S., Grignani, E., Cottica, D., Berri, A., Picco, A.M., Dacarro, C., 2009. Assessment of airborne microorganism contamination in an industrial area characterized by an open composting facility and a wastewater treatment plant. *Environmental Research.* 109, 135-142.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.
- Herr, C.E.W., Nieden, A., Jankofsky, M., Stilianakis, N.I., Boedeker, R.-H., Eikmann, T.F., 2003. Effects of bioaerosol polluted outdoor air on airways of residents : a cross sectional study. *Occup. Environ. Med.* 60, 336-342.
- Herrero, A., Ruiz, S., Bustillo, M., Morales, P., 2006. Study of airborne fungal spores in Madrid, Spain. *Aerobiologia.* 22, 133-140.
- Hryhorczuk, D., Curtis, L., Scheff, P., Chung, J., Rizzo, M., Lewis, C., Keys, N., Moomey, M., 2001. Bioaerosol emissions from a suburban yard waste composting facility. *Ann. Agr. Env. Med.* 8, 177-185.
- Kampfer, P., Jureit, C., Albrecht, A., Neef, A., 2002. Immission of microorganisms from composting facilities. In : S. Klammer (Ed.), *Microbiology of composting.*
- Le Goff, O., Bru-Adan, V., Bacheley, H., Godon, J.J., Wery, N., 2010. The microbial signature of aerosols produced during the thermophilic phase of composting. *Journal of Applied Microbiology.* 108, 325-340.
- Li, D.-W., Kendrick, B., 1994. Functional relationships between airborne fungal spores and environmental factors in Kitchener-Waterloo, Ontario, as detected by Canonical correspondence analysis. *Grana.* 33, 166 - 176.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K.H., 2004. ARB : a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32, 1363-1371.
- Marshall, M.N., Cocolin, L., Mills, D.A., VanderGheynst, J.S., 2003. Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. *J Appl Microbiol.* 95, 934-948.
- Millner, P.D., Bassett, D.A., Marsh, P.B., 1980. Dispersal of *Aspergillus fumigatus* from Sewage Sludge Compost Piles Subjected to Mechanical Agitation in Open Air. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 1000-1009.
- Neef, A., Schäfer, R., Beimfohr, C., Kämpfer, P., 2003. Fluorescence based rRNA sensor systems for detection of whole cells of *Saccharomonospora* spp. and *Thermoactinomyces* spp. *Biosensors and Bioelectronics.* 18, 565-569.
- Nikaeen, M., Hatamzadeh, M., Hasanzadeh, A., Sahami, E., Joodan, I., 2009. Bioaerosol emissions arising during application of municipal solid-waste compost. *Aerobiologia.* 25, 1-6.
- Partanen, P., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen, P., Romantschuk, M., 2010. Bacterial

- diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiology*. 10.
- Peccia, J., Hernandez, M., 2006. Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science : A review. *Atmos Environ*. 40, 3941.
- Porta, D., Milani, S., Lazzarino, A., Perucci, C., Forastiere, F., 2009. Systematic review of epidemiological studies on health effects associated with management of solid waste. *Environmental Health*. 8, 60.
- Rintala, H., Pitkaeranta, M., Toivola, M., Paulin, L., Nevalainen, A., 2008. Diversity and seasonal dynamics of bacterial community in indoor environment. *BMC Microbiology*. 8.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J., Insam, H., Swings, J., 2003. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Ann Microbiol*. 53, 349-410.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 4, 406-425.
- Sánchez-Monedero, M.A., Stentiford, E.I., 2003. Generation and Dispersion of Airborne Microorganisms from Composting Facilities. *Trans IChemE*. 81, 166-170.
- Singh, S., Madlala, A.M., Prior, B.A., 2003. *Thermomyces lanuginosus* : properties of strains and their hemicellulases. *Fems Microbiology Reviews*. 27, 3-16.
- Steger, K., Sjogren, A.M., Jarvis, A., Jansson, J.K., Sundh, I., 2007. Development of compost maturity and Actinobacteria populations during full-scale composting of organic household waste. *J Appl Microbiol*. 103, 487-498.
- Stepalska, D., Wolek, J., 2009. Intradiurnal periodicity of fungal spore concentrations (*Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Didymella*, *Ganoderma*) in Cracow, Poland. *Aerobiologia*. 25, 333-340.
- Stetzenbach, L.D., Buttner, M.P., Cruz, P., 2004. Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Current Opinion in Biotechnology*. 15, 170.
- Strom, P.F., 1985. Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting. *Appl Environ Microbiol*. 50, 906-913.
- Swan, J.R.M., Kelsey, A., Crook, B., Gilbert, E.J., 2003. Occupational and environmental exposure to bioaerosols from composts and potential health effects - A critical review of published data.
- Sykes, P., Jones, K., Wildsmith, J.D., 2007. Managing the potential public health risks from bioaerosol liberation at commercial composting sites in the UK : An analysis of the evidence base. *Resources, Conservation and Recycling*. 52, 410.
- Taha, M.P.M., Pollard, S.J.T., Sarkar, U., Longhurst, P., 2005. Estimating fugitive bioaerosol releases from static compost windrows : Feasibility of a portable wind tunnel approach. *Waste Manag*. 25, 445-450.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itävaara, M., 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment : a review. *Biore-sour Technol*. 72, 169-183.
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J.A.M., 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 Nucleic Acids Research. 35, 71-74.
- Wu, Z., Tsumura, Y., Blomquist, G., Wang,

- X.R., 2003. 18S rRNA gene variation among common airborne fungi, and development of specific oligonucleotide probes for the detection of fungal isolates. *Appl Environ Microbiol.* 69, 5389-5397.
- Miyauchi, K., Endo, G., 2008. Successions of bacterial community in composting cow dung wastes with or without hyperthermophilic pre-treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 81, 771-781.
- Yamada, T., Suzuki, A., Ueda, H., Ueda, Y.,

Choix d'indicateurs pertinents pour l'analyse
de la dispersion des bioaérosols émis sur les
plates-formes de compostage

Article 3 : “Choice of relevant microbial indicators to
analyse the dispersal of composting bioaerosols”

L'étude de la dispersion des bioaérosols émis sur les plates-formes de compostage est compliquée par le fait qu'il n'existe pas de traceurs pour mettre en évidence spécifiquement ces bioaérosols dans l'air. Les études publiées utilisent des groupes microbiens larges et pas ou peu spécifiques : bactéries cultivables, actinomycètes thermophiles cultivables, champignons.

L'objectif est d'étudier l'émission et la dispersion par plusieurs indicateurs microbiens afin de sélectionner les plus pertinents.

Sept groupes microbiens ont été étudiés : micro-organismes totaux (quantifiés par microscopie à épifluorescence), les bactéries viables, les bactéries et les champignons cultivables ainsi que les trois indicateurs développés précédemment.

Ces différents groupes microbiens ont été quantifiés dans l'air au voisinage d'une activité de retournement d'andain en phase de fermentation. Ils ont été examinés au regard des critères établis :

- forte augmentation des concentrations lors du retournement
- faible variabilité de l'indicateur d'un site à l'autre

Les quatre indicateurs les plus pertinents ont été retenus. Il s'agit des bactéries viables et des trois indicateurs :

- NA07 affilié à *Saccharopolyspora rectivirgula*
- NC38 affilié à la famille des *Thermoactinomycetaceae*
- EQ05 affilié à *Thermomyces*

Ensuite ces indicateurs ont été suivis en aval d'une activité de retournement sur douze plates-formes de compostage traitant différents types de déchets afin d'étudier la dispersion des bioaérosols.

Il en ressort que sur des distances inférieures à 50 m de la source d'émission, il y a systématiquement un impact du bioaérosol. Les prélèvements correspondants ont été effectués sur la plate-forme de compostage. A environ 100 m en aval à l'extérieur du site, un impact est observé tandis qu'à des distances supérieures (plusieurs centaines de mètres), la concentration des indicateurs est similaire à celle du bruit de fond de l'air, sauf quand le niveau d'émission est élevé et le vent fort.

Cette étude a permis de sélectionner des indicateurs permettant de suivre la dispersion des bioaérosols émis lors du retournement d'andain en cours de fermentation. Les bactéries viables sont des indicateurs non spécifiques du compost. En effet, cet indicateur permet de suivre une émission provenant d'un écosystème "actif", car dans l'air, la concentration des bactéries viables est faible. Cet indicateur ne permet pas de distinguer les bioaérosols de compostage parmi les autres sources émissives, c'est pourquoi, il faut le coupler à des indicateurs spécifiques du compost comme NA07, NC38 et EQ05.

Remarque : Cet article rassemble des résultats obtenus dans le cadre de la thèse (indicateurs moléculaires quantifiés par PCRq) et des données obtenues dans le cadre du

projet “Étude des bioaérosols générés sur les sites de compostage, définition d’indicateurs d’exposition” en collaboration avec VEOLIA Environnement (bactéries et champignons cultivables, bactéries viables, micro-organismes totaux quantifiés par microscope à épifluorescence).

Choice of relevant microbial indicators to analyse the dispersal of composting bioaerosols

Olivier Le Goff¹, Hélène Bacheley², Karine Delabre², Jean-Philippe Steyer¹, Jean-Jacques Godon¹, Nathalie Wéry^{1*}

¹INRA, UR50, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, Narbonne F-11100

² Veolia Environnement Recherche et Innovation, 291 avenue Dreyfous Ducas, Limay, France

*Corresponding author. Mailing address : INRA, UR50, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, Narbonne, F-11100, France. Phone : 33 468 425 186. Fax : 33 468 425 160. E-mail : weryn@supagro.inra.fr

ABSTRACT

When analyzing the dispersal of bioaerosols emitted on industrial composting platforms, the lack of any specific indicator makes it difficult to trace microorganisms aerosolized from compost among those naturally present in air. The aim of this study was to select the most relevant microbial groups which can be used as indicators in order to study composting bioaerosols dispersal. Seven microbial groups were quantified in natural environments ('background' concentration in air) and on composting sites : cultivable bacteria and fungi, total microorganisms (epifluorescence microscopy), viable bacteria and 3 microbial indicators quantified by qPCR which had been previously shown as compost-specific. These last 4 indicators were selected as the more relevant based on the following characteristics : a) a higher concentration in air during a compost turning activity than in background air, b) a low variability of the concentration from one site to another. These four indicators were then quantified on site (12 platforms analysed) and in air samples collected downwind, during the turning of compost windrows in thermophilic phase to analyze the dispersal of composting bioaerosols emitted during this activity. An impact was always observed for distances below 50 meters (sampling points located on the platforms). Outside the platforms, concentrations of indicators reached background levels at distance higher than 100 meters (generally 200 to 300 meters, depending on emission levels and meteorological conditions).. In order to analyse the dispersal of composting bioaerosols around composting platforms, the relevancy of coupling a non specific indicator (viable bacteria) to microbial indicators specific to a 'compost' origin in air is here demonstrated.

Keywords : Bioaerosol, compost, dispersion, indicators, qPCR

INTRODUCTION

Analysing the dispersal of bioaerosols emitted on composting platforms is not an easy task, notably due to the fact that no specific indicators have been defined until now. Therefore there is no way to trace microorganisms aerosolized from compost among those naturally present in air.. Previous studies on composting bioaerosol dispersal used the quantification in air samples of the following microbial groups : cultivable bacteria, fungi, the actinomycetes, and *Aspergillus fumigatus* (Albrecht et al., 2007, Grisoli et al., 2009, Hryhorczuk et al., 2001, Kampfer et al., 2002, Millner et al., 1980, Nikaeen et al., 2009, Sánchez-Monedero and Stentiford, 2003, Taha et al., 2007). Furthermore, these microorganisms were quantified using cultural methods, which are known as underestimating the number of microorganisms present in air, the cultivable fraction representing less than 1% of the total number of cells (Amann et al., 1995, Peccia and Hernandez, 2006).

In a previous study, the microbial signature (core species) of bioaerosols emitted during a turning activity on five composting platforms was defined (Le Goff et al., 2010). Among these core species, three phylotypes have been validated as specific composting indicators. Indeed, their concentrations in air close to the turning of composting piles in fermentation is higher than their basal concentrations measured in natural environments not impacted by a composting activity, and to their concentrations measured upwind, outside the composting platforms (Le Goff, submitted). The bacterial phylotypes, NA07 and NC38 belong respectively to *Saccharopolyspora rectivirgula* and to the *Thermoactinomycetaceae*. The fungal phylotype, EQ05, was related to *Thermomyces*. Three qPCR systems specific to each target (NA07, NC38 and EQ05) were designed based on 16S or 18S rDNA sequences (Le Goff, submitted). The aim of this study was to compare the relevancy of several microbial groups to study the dispersal of composting bioaerosols. In a first step, the most relevant indicators were selected among microbial groups previously quantified when analyzing bioaerosol dispersal (cultivable bacteria and fungi, total number of cells using epifluorescence microscopy) and new potential indicators (viable bacteria, molecular indicators quantified by qPCR). Then the selected indicators were quantified in air samples collected on twelve composting plants to analyse the dispersal of bioaerosol emitted during the turning of compost windrows in thermophilic phase.

MATERIALS AND METHODS

Air sample collection

Air collector

All air samples were collected by the biocollector Coriolis[®] μ (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) at a flow rate of 300 L min⁻¹, for time period going from 30 minutes (samples collected on the composting plants) to more than one hour (other samples). For low concentration level, several collection liquids of 30 minutes were pooled together. The particles were collected into a sterile solution of 0.005% Tween 20 (Sigma, St Louis, MO, USA) in milliQ water. The solution was filtered under sterile conditions at 0.2 μ m on

polyethersulfone filter (Supor 200; Pall Corporation, Ann Arbor, MI). Each filter was kept frozen at -80°C in a 2 mL sterile tube until DNA extraction. The DNA extraction was already described in Le Goff *et al.*, (Le Goff, et al., 2010).

Types of air samples

Twelve composting platforms, all operating in open windrows, were analyzed. For ten composting sites, three bioaerosol samples were collected in downwind during the turning of compost windrows in thermophilic phase. For two sites, five bioaerosol samples were collected in downwind to the turning activity. For all the sites, one bioaerosol sample was collected in upwind, outside the composting platform, with no emitting activity. Several samples were realized at the same location as some downwind samples before the start of turning. The table 7.1 presents the different characteristics of each compost windrow, the distance to the emission source (turning) and the meteorological conditions during the sampling and the period of collect. Eleven bioaerosol samples were collected in various natural environments not impacted by the composting activity.

TABLEAU 7.1: Characteristics of each compost windrow and meteorological conditions during air sampling

Site	Sample	Waste	Compost age and period collection (weeks)	Compost temperature (°C)	distance to the turning (m)	Technology used for windrow turning	Forced aeration	Meteorological conditions					
								Wind (m s ⁻¹)	Temperature (°C)	Moisture (%)			
A	Turning	Green waste	8 April	50	1-2	Wheel loader	No	2	26	57			
	Downwind										3	26	50
	Downwind										4	26	54
B	Turning	Municipal solid waste	1-10 ¹ August	44-69	5-20 ²	Windrow turning machine	No	4	21	72			
	Downwind										4	21	72
	Downwind										3	22	75
C	Turning	Green waste and sludge	3 June	60	15	Wheel loader	Yes	1	25	61			
	Downwind										1	26	56
	Downwind										1.5	31	44
D	Turning	Green waste, biowaste ³	6 November	55	1	Wheel loader	Yes	4	6	100			
	Downwind										4	6	100
	Downwind										3	7	97
E	Turning	Green waste and sludge	6 August	60	10	Wheel loader	Yes	3	23	80			
	Downwind										3	23	73
	Downwind										3	23	74
F	Turning	Municipal	13	nd ⁴	2	Wheel loader	Yes	3	15	84			

Site	Sample	Waste	Compost age and period collection (weeks)	Compost temperature (°C)	distance to the turning (m)	Technology used for windrow turning	Forced aeration	Meteorological conditions		
								Wind (ms ⁻¹)	Temperature (°C)	Moisture (%)
	Downwind	solid	April		70			1	20	84
	Downwind	waste			120			2	16	84
G	Turning	Green	5-71 ¹	nd	5-50 ²	Windrow	Yes	1	4	100
	Downwind	waste	November		80	turning		1	4	100
	Downwind				150	machine	1	7	100	
H	Turning	Green waste	3	nd	1	Wheel loader	Yes	3	8	100
	Downwind	and sludge	February		30			4	7	100
	Downwind				80		4	9	100	
Ioct	Turning	Green waste,	7	68-70	1	Wheel loader	No	1	16	75
	Downwind	industrial biowaste	October		30			3	16	75
	Downwind	and sludge			55		3	19	75	
Inov	Turning	Green waste,	10	nd	1	Wheel loader	No	4	11	85
	Downwind	industrial biowaste	November		30			3	11	85
	Downwind	and sludge			55		5	12	5	
J	Turning	Green	2	nd	1	Wheel loader	Yes	0	9	100
	Downwind	waste	December		20			0	9	100
	Downwind				30		1	11	100	
K	Turning	Green	4	80	10-15	Wheel loader	No	5	22	62

Site	Sample	Waste	Compost age and period collection (weeks)	Compost temperature (°C)	distance to the turning (m)	Technology used for windrow turning	Forced aeration	Meteorological conditions		
								Wind (ms ⁻¹)	Temperature (°C)	Moisture (%)
	Downwind	waste	September		50			5	22	58
	Downwind	and sludge			110			4	19	75
	Downwind				240			5	22	53
	Downwind				550			6	19	74
L	Turning	Green	2	65	1	Wheel loader	Yes	0.5	12	74
	Downwind	waste	November		60			3	13	83
	Downwind				110			0.7	17	65
	Downwind				280			2.5	13	84
	Downwind				530			0.5	10	85

¹ Several composting windrows were turned

² The distance increased because the windrow turning machine was moving on the windrow

³ Industrial biowaste, manure, mycelium, fats, waste from cosmetic industries

⁴ Not determined

Parameters measured during sampling

During the collect on the composting platforms, several parameters such as temperature, moisture, speed and the wind direction were measured presented in the table 7.1.

Culture based enumeration

The TCS (tryptophan casein soy) agar medium and MEA medium (malt extract 30 g, peptone 3 g and agar 15 g L⁻¹) were specific for the bacteria and the fungi respectively. Several plates were incubated at 22°C for the bacteria and the fungi and colonies were counted after 48h.

Enumeration of total bacteria by epifluorescence (DAPI)

20 mL of sterile water containing 0.25 mg of DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) filtered at 0.2 µm were added to the filter and incubated at room temperature for 20 min. The filter was rinsed with 5 mL of sterile water. The filter was mounted on slides with microscope oil. Samples were counted with an epifluorescence microscopy Olympus. A total of 10 fields evenly spaced on the filter area were counted for each sample at 1000x magnification.

Viable bacteria

In solid phase cytometry (SPC), the principles of epifluorescence microscopy and flow cytometry are combined. Micro-organisms are retained on a membrane filter, fluorescently labelled and automatically counted by the Chemscan RDI laser-scanning device. Each detected spot can visually be inspected using an epifluorescence microscope.

The sample was filtered at 0.2 µm on filter Wathman then 1 mL CSE/2 was added, the solution was filtered at 0.2 µm and protect this solution from light. 550 mL of ChemSol A4 added in a Petri dish and the filter was transferred and incubates at 37°C for 1 h. The filter was incubated at 30°C for 30 min on new Petri dish with 550 mL of ChemChrome V6 (ChemChrome V6 diluated 1 :1000 in the buffer ChemSol B16). After incubation, filters can be stored at 4°C on the ChemChrome V6 solution for 12 h.

After the labeling of the microorganisms, the filter was placed in a holder, on top of a support pad (Chemunex) moistened with 600 µL of buffer ChemSol B16. The filter was scanned by the Chemscan RDI. This solid phase cytometer consists of an argon laser, emitting light of 488 nm and two photomultiplier tubes, which detect the fluorescent light emitted by the labelled cells. The produced signals are processed by a PC, applying a series of software discriminants to differentiate valid signals (labelled bacteria/fungi) from fluorescent particles. Results were displayed as green spots on a membrane filter image in a primary and, after software elimination of background, secondary scan map (Vanhee et al., 2008).

*Quantification of microbial indicators affiliated to *Saccharopolyspora (NA07)*, *Thermomyces (EQ05)* and to the *Thermoactinomycetaceae (NC38)* by qPCR*

The table 7.2 presents the primers and the probe for each qPCR system and the optimal concentration employed. These three qPCR systems were designed and tested in a previously study (Le Goff et al., submitted). The qPCR program was the following : 95°C

for 10 min and 40 cycles at 95°C for 15s and 60°C for 1 min. The quantitative PCR reaction contained 12.5 µL of qPCR Master Mix Plus (2X, including buffer, dNTPs, Hot-GoldStar DNA polymerase, MgCl₂ (5mM final concentration) and the passive reference (rox)) (Eurogentec), primers at their optimal concentration, 100nM of probe and 5 µL of DNA. The total volume was 25 µL. Negative controls (no DNA added) were performed. All qPCR assays were performed an ABI Prism 7000 Sequence Detection System version 1.2 (Applied Biosystems) or in triplicates (the samples collected on composting plants) or in duplicates (other samples).

For detected PCR inhibition, an internal positive control (IPC) was used according to the manufacturer's instructions (Eurogentec, Liege, Belgium). The IPC control was detected using a Yakima-Yellow[®] (Eurogentec) labeled probe and the target template using a FAM-labeled probe. The reaction mixture was the following : 25 µL of qPCR Master Mix (2X) (Eurogentec), 1 µL of IPC mix, 0.5 µL of IPC DNA, primers at their optimal concentration, the probe at 100nM, sterile water and 5 µL of DNA sample, in a total volume of 50 µL. The program was the same as described above.

Another technique was also employed, three different dilutions of each DNA sample were amplified and the initial calculated concentrations were compared in pairs. Inhibited PCR reactions produced lower values which were eliminated from the analyze. The choice to the technique resided in the DNA concentration in the sample, for concentrated samples enabling different levels of dilution, this second approach was chosen to test for the presence of inhibitors and for samples containing a small number of target genes, the IPC was used. The standard curves were obtained by amplifying serial 10 fold dilutions of plasmid containing the DNA target sequence (10^7 to 10^0 rDNA copies µL⁻¹). The concentration of the concentrated plasmid solution was measured by the Nanoquant (Infinite M200, Tecan, Austria). Each standard was tested in triplicate. For each assay one standard curve was generated.

For each qPCR system, the limit of quantification was defined in two steps. The limit of quantification for the standards corresponded to the lowest concentration of standard at which 95% of the PCR were positive. The limit of quantification for the NA07 system was 1 copy of 16S rDNA m⁻³, for NC38 system 10 copies of 16S rDNA m⁻³ and for EQ05 system 100 copies of 18S rDNA m⁻³. For each sample, the limit of quantification was determined considering the limit of quantification defined for each qPCR systems at the lowest positive dilution of the DNA extract. This limit was expressed in number of copy of rDNA by cubic meter of collected air.

The qPCR efficiency (E) for the NA07 and NC38 quantification systems were included between 96 and 100% with a correlation coefficient always superior at 0.96. For the EQ05 quantification system, E varied between 77 and 80% and the correlation coefficient was always above 0.99. Concerning the negative controls, no signal was detected after 40 cycles for the three qPCR systems. Arithmetic means and standard deviation were calculated using values from qPCR replicates. The number of 16S rDNA or 18S rDNA copies per

cubic metre was estimated for each sample.

Data processing

The background concentration was defined by the median, calculated taking the limit of quantification for the samples not detected. The difference expressed in logarithmic units between the bioaerosol samples collected in downwind to the emission source and the background.

TABLEAU 7.2 – Quantitative real-time PCR systems

Name	Primers/probes	Sequences	Position ¹	Amplicon size	Concentration in nM
NA07					
W246	Forward	5'-TGCAAGTCGAACGCTGAAGC-3'	F56-75		200
W248	Reverse	5'-TGCGGCAGAAATGTCTATCC-3',	R189-169	141 bp	200
W253	MGB probe	5'-6FAM-ATCCACCCACCACAA-NFQ-3'	R99-83		100
NC38					
W267	Forward	5'-CTGCAAGACCCGGGATAACTGC-3'	F136-156		150
W268	Reverse	5'-CCCATCTGCAAGTGACGACT-3',	R232-211	110 bp	150
W269	Probe	5'-6FAM-CCGGAGCTAATACCGGATAAGAGGCTTTTC-TAMRA-3'	F163-192		100
EQ05					
W270	Forward	5'-AATTGCGATAACGAACGAGACC-3'	F1092-1114		150
W271	Reverse	5'-GAGCCGATAGTCCCCCTAAGA-3'	R1168-1147	78 bp	150
W272	Probe	5'-6FAM-CCTTAAATAGCCCCGCCGCTTTT-TAMRA-3'	F1119-1143		100

¹Corresponding position in *Escherichia coli* 16S rDNA gene
6-FAM (Carboxyfluorescein); NFQ (Non Fluorescent Quencher); TAMRA (Tetramethyl-6-Carboxyrhodamine)

RESULTS

Seven microbial parameters were analysed : cultivable bacteria and fungi, total number of cells (epifluorescence microscopy), viable bacteria (cytometry), and three indicators measured by qPCR : 'NA07' belonging to *Saccharopolyspora rectivirgula*, 'NC38' to the *Thermoactinomycetaceae* and 'EQ05' to *Thermomyces*. In a first step, the basal concentration in air ('background concentration') of each microbial group was defined, by quantifying them in air samples not impacted by a composting activity. Then, these 'basal' concentrations were compared to those measured on a composting platform during one of the bioaerosol emitting activity (turning of compost piles).

Background concentration

The background concentration was defined as the concentration observed 'naturally' in air (no composting activity). It was determined using air samples collected in natural environments and upwind of composting plants. The table 7.3 presents, for each of the seven microbial groups, the median in logarithm units and the number of independent samples used to determine this value. As expected, the highest value was observed for the DAPI method : $5.2 \log_{10} \text{ cells m}^{-3}$. The background concentration for viable bacteria, culturable bacteria and fungi was around $3 \log_{10} \text{ CFU m}^{-3}$. Concerning the specific indicators measured by qPCR, the bacterial systems NA07 and NC38 showed background concentrations close to $3 \log_{10} \text{ copies of 16S rDNA m}^{-3}$. For EQ05, the background concentration was defined to $3.4 \log_{10} \text{ copies of 18S rDNA m}^{-3}$.

TABLEAU 7.3 – Background concentration of microorganisms in air

Parameters	Units	Background concentration in log 10 units (mediane)
Total bacteria (DAPI)	cells m^{-3}	5,21 (n ¹ =17)
Viable bacteria	cells m^{-3}	3,30 (n=17)
Culturable bacteria	CFU m^{-3}	3,18 (n=17)
Culturable fungi	CFU m^{-3}	3,13 (n=17)
NA07	copies of 16S rDNA m^{-3}	2,96 (n=18)
NC38	copies of 16S rDNA m^{-3}	2,65 (n=18)
EQ05	copies of 18S rDNA m^{-3}	3,43 (n=18)

¹number of samples

Selection of microbial indicators to trace composting bioaerosols

To determine the most relevant indicators to study composting bioaerosol dispersal, two criteria were applied : a) the indicator must be present at a higher concentration in air during composting activities than in 'background' air, b) the indicator concentration must

show a low variability from one site to another.

In Figure 7.1, differences between concentrations observed during compost turning on different composting plants and the background concentration are represented in boxplots. This figure enables to compare the different parameters with the background concentration (represented when y-axis is equal to zero) and also to compare the parameters between each other.

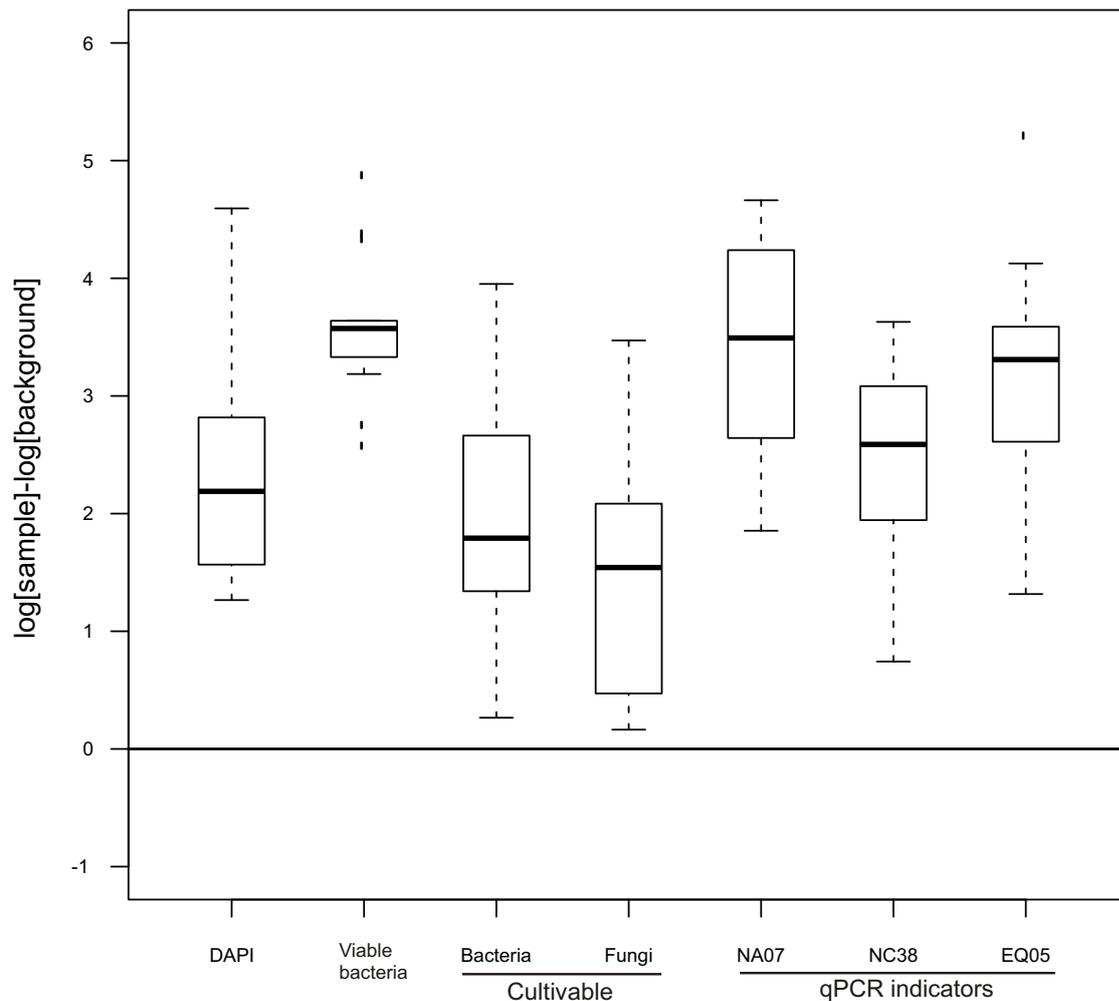


FIGURE 7.1 – Differences in logarithmic units between air samples collected during turning of compost windrows in thermophilic phase and the background concentration (value on y-axis to zero)

The cultivable bacteria and fungi showed the smallest increase of the concentration in air during the turning, compared to the background concentration. The 'total bacteria' and the 'cultivable bacteria' parameters presented the highest variability (4 logarithmic units). For viable bacteria, NA07, NC38 and EQ05, the difference between concentrations observed during compost turning on different composting plants and the background was

superior to two logarithm units in average. The indicators 'viable bacteria' and NA07 presented the higher median values (above 3 logarithmic units). The lowest variability (0.3 logarithm unit) observed was for the viable bacteria.

Out of the seven indicators measured, four were selected as the most relevant indicators for analyzing the dispersal of composting bioaerosols : the viable bacteria, NA07, NC38 and EQ05. These four microbial groups showed an important increase of their concentration during the composting activity studied, compared to their 'natural' concentration in air. Viable bacteria showed a low variability.

Dispersal of composting bioaerosols

The dispersal of composting bioaerosols emitted during the turning of compost piles was analysed by comparing the concentration close to the source of bioaerosol emission ('turning' sample located at less than 50m of the turning), at a point located downwind on site ('downwind 1' sample located 20–85 m from the turning) and at a point located further away downwind ('downwind 2'), outside the composting plant (55–550 m). During the dispersal analysis, two hypotheses were made : the dilution effect of the compost bioaerosol in air was not considered and the wind speed was considered as constant. The dispersal of composting bioaerosols was analyzed with four indicators : viable bacteria, NA07, NC38 and EQ05. For each samples collected on the composting plants, the difference with the background was determined. The data obtained for each collecting point of each composting plants were pooled to show the effect of bioaerosol dispersal on the concentration of the indicators (figure 7.2).

The concentration downwind the turning point decreased with the distance for all the indicators. This decrease was around one logarithm unit between the turning point and the first collecting point downwind, located on the site, whereas the difference between the second point, located outside the site and the emission source was around 2 logarithm units. At the second point the concentration of the four indicators was always superior to the background concentration, showing that an impact of the turning activity can be observed downwind outside the composting plant.

The dispersal of the four indicators was then analyzed for each site separately. The figure 7.3 presents the dispersal of the four indicators for each composting plants. The distances of the downwind 2 samples to the turning of compost windrows were less than 100 meters, for six of the twelve composting platforms (table 7.1). The emission level at the turning point was variable for each composting sites due to differences in the technology used for the turning, the composting process and the type of waste composted. The indicators had different compartments during the dispersal.

The relation between the concentration for each indicator and the distance to the emission source was investigated and the regression curve was drawn when the determination coefficient was superior or equal to 90% (figure 7.3). Nine composting plants on twelve presented a correlation with at least one indicator. Three composting plants (C, E and H) presented a relation between the concentration of the four indicators and the

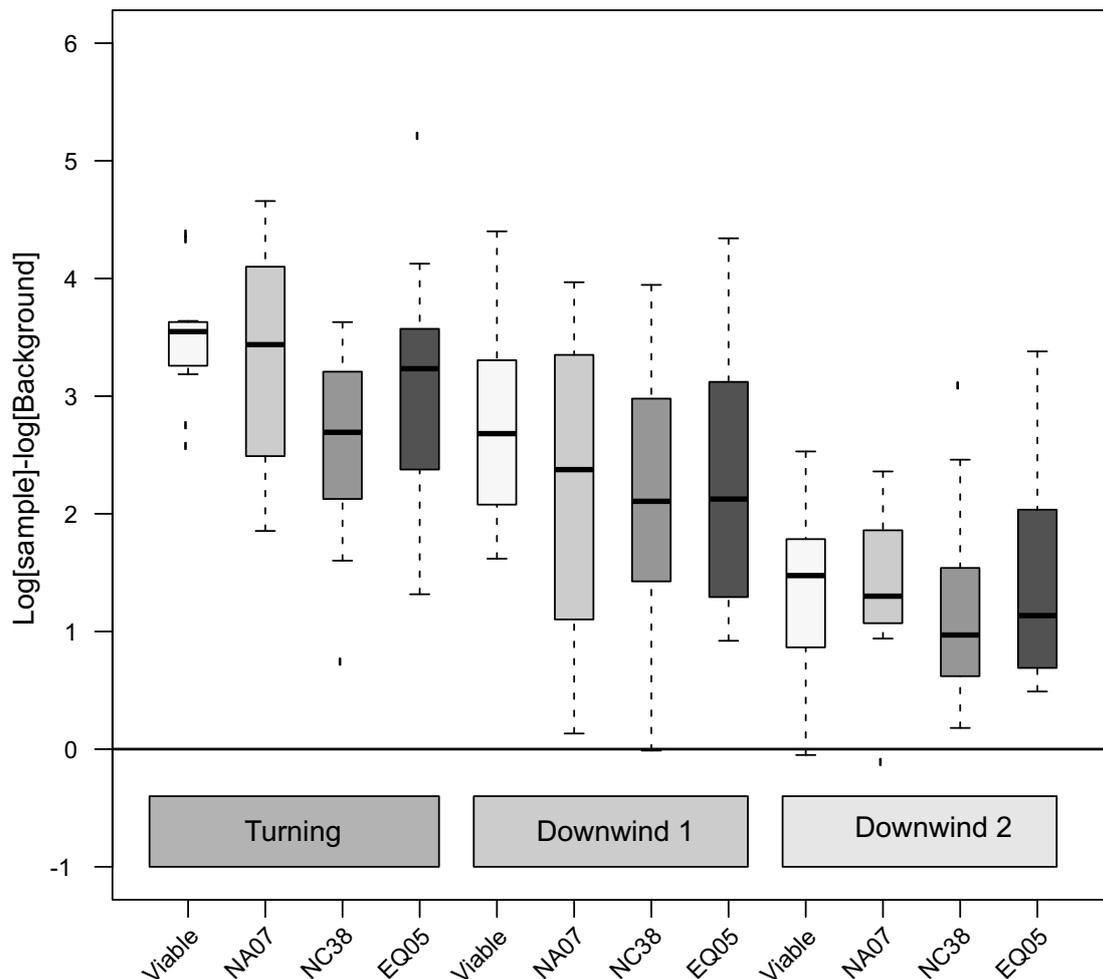


FIGURE 7.2 – Differences in logarithmic units between air samples collected in downwind during turning of compost windrows and the background (value on y-axis to zero)

distance, whereas the relation with three indicators was observed only for the sites B. And a relation with two indicators was observed on two sites G and J.

By extrapolation of the regression curves, it could be estimated that the background level (represented when the value on the y-axis is equal to zero) can be reached at around 200 to 300 meters for several composting plants. On site J, the quick decrease of concentration observed (background level reached at less than 50 meters), is due to the absence of wind during all the time of collect (table 7.1).

For the composting sites B, E, H and J, the slope coefficient of the regression curves observed for the indicators 'viable bacteria' and NA07 were similar so they reached the background concentration at the same distance. For other composting platforms (C, E, H, G), the concentration of the viable bacteria decreased to the background concentration more rapidly than the other indicators concentration.

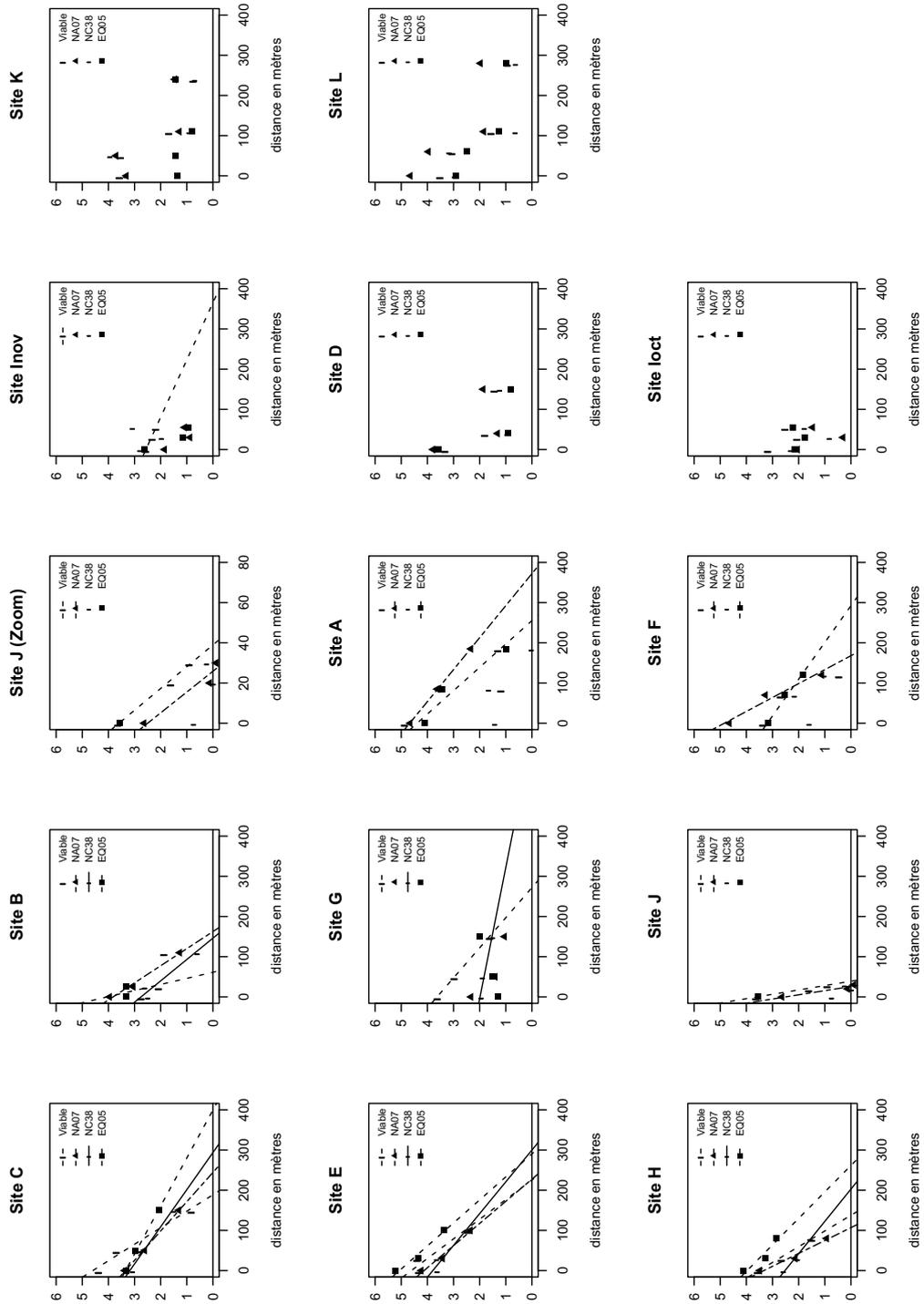


FIGURE 7.3 – Dispersal of NA07, NC38, EQ05 and viable bacteria during a turning activity on the twelve composting platforms. Regression curves were represented when the correlation coefficient was higher or equal at 90%.

DISCUSSION

During this study, the capacity of seven microbial groups to be used to study the dispersal of composting bioaerosols was investigated. To identify the most relevant indicators, several criteria were observed : a) the concentration in air during the turning of composting windrows should be much higher than the natural 'background' concentration in air samples not impacted by composting activities (increase of at least two logarithmic units), b) the variability should be low. Based on these criteria, out of the seven microbial groups studied, four have been selected : the viable bacteria and the three indicators quantified by qPCR NA07, NC38 and EQ05 previously shown as been specific to composting bioaerosols (Le Goff *et al.*, submitted). The NA07, NC38 and EQ05 indicators are affiliated to thermophilic species (*Saccharopolyspora*, *Thermoactinomycetaceae*, *Thermomyces* respectively), and probably multiply during the fermentation phase of the composting. Furthermore, *Saccharopolyspora rectivirgula*, and *Thermoactinomycetaceae* sp. have been previously identified in composting bioaerosols (Kampfer, et al., 2002, Lacey, 1971).

The concentration of viable bacteria detected in the 'background' air samples was close to 10^3 cells m^{-3} . Vanhee et al. used the same technique to quantify the viable bacteria in various outdoor environments and obtained values included between 100 and 6×10^4 bacteria cells m^{-3} . The concentration of viable bacteria in air is lower than other environments such as pig stable 10^5 - 10^6 bacteria cells m^{-3} (Vanhee, et al., 2008). This is probably due to the extreme conditions present in air (temperature, relative humidity. . .), in which microorganisms are subject to various stresses (UV, desiccation) (Potts, 1994).

In very active biological ecosystems such as compost, the concentration in viable bacteria is high. There is therefore an interest to follow the dispersal of composting bioaerosols by this indicator. Nevertheless, this indicator cannot be used alone since it is not specific to compost and it does not distinguish the composting bioaerosols from other bioaerosols emitted by different environmental or anthropogenic sources. At the opposite the indicators NA07, NC38 and EQ05 are considered as specific to composting bioaerosols (Le Goff et al., submitted).

Discrepancy between the dispersal of the different indicators

The microorganisms can occur in the air : i) as single cells, ii) as aggregates of cells or fragments of cells, iii) as spores, iv) or linked to dust particles (Gorny et al., 1999). The higher levels of bacteria observed around composting sites, and especially the higher levels of bacteria observed during periods of activity are consistent with several other microbial studies on composting platforms.

Hyhorczuk *et al.* reported that the dispersal of *Aspergillus* and thermophilic actinomycetes was observed until 540 meters downwind the site. At 30 meters downwind to the composting windrows, the bacterial concentration was five times higher than the concentration in the background air (Hryhorczuk, et al., 2001). Different results were obtained by Reinthaler *et al.*, they reported bacterial concentrations of $4,5 \times 10^3$ CFU m^{-3} at 3 meters from composting windrows, but only 200 to 480 CFU m^{-3} at 200-700 metres from

the composting facility, which correspond to the background concentration in air. These authors suggested that no elevated concentration should be expected beyond a distance of 150 meters from composting plants (Reinthal et al., 1997).

In another study, for distances of up to 200 m, the concentration of bacteria and mesophilic fungi were found to be 2 to 3 orders of magnitude lower compared to the concentrations near the sources of emission, for one composting platform and 1 to 2 orders of magnitude for another site. The results were similar for the thermotolerant fungi and thermophilic actinomycetes. For a composting site, at 600 metres in downwind to the emissive source (turning), the microbial concentration in the composting bioaerosols was similar to the background concentration (Fischer et al., 2008).

In terms of regulation, the minimal distance between a composting platforms and neighborhood residents was put to 250 meters in England and 300 meters in Austria (Reinthal, et al., 1997, Swan et al., 2003). In France, the minimal distance for the open platforms varied between 100 and 200 m according to the legislation associated with composting plants.

In the current study, the dispersal of composting bioaerosols was studied on twelve composting platforms using four different indicators and usually the concentration observed outside the plant in downwind locations during the turning of composting windrows in thermophilic phase decreased with the distance and reached the background concentration at around 200 to 300 metres. Some specific characteristics of the different indicators can affect their dispersal. This could explain why the different indicators did not show the same dispersal. *Saccharopolyspora rectivirgula* produces spores in chains (2 to 15 spores), each having a diameter ranging from 0.7 to 1.5 μm (Kurup and Agre, 1983). The second bacterial phylotype, NC38, was assigned to *Thermoactinomycetaceae* family which is known as emitting only one spore (Matsuo et al., 2006, Waksman and Corke, 1953) of diameter included between 0.8 and 1.5 μm (Prescott et al., 1993, Waksman and Corke, 1953). EQ05 phylotype is affiliated to *Thermomyces* species which a known to produce spore of much bigger size than the bacterial spores. Differences in number and size of spore emitted may induced different emission levels from the same compost, as well as affect dispersal properties.

Recommendations to study the dispersal of composting bioaerosols

In this study, four microbial parameters (viable bacteria, NA07, NC38 and EQ05) relevant to analyse the dispersal of composting bioaerosols were defined. Out of these four indicators, three, NA07, NC38 and EQ05 are specific to bioaerosols emitted during industrial composting, whereas the viable bacteria can be considered as a general indicator of the dispersal. These indicators have been applied on twelve composting platforms for study the dispersal of bioaerosols. Although different dispersal profiles were obtained for one site to another and even from one indicator to another for the same site, a common tendency was observed. For all the composting platforms studied, an impact was observed for a distance below 50 meters of the emission source. The corresponding air samples

were all collected on the composting sites. At around 100 meters downwind the emission, (sampling points located outside the site), an impact was frequently observed. Further away downwind, the concentration of indicators was generally similar to the base level in air ('background'), with the exception of high emission levels and strong wind.

As a conclusion, this study lead to the definition of four microbial indicators (viable bacteria, NA07, NC38 and EQ05) relevant to analyse the dispersal of composting bioaerosols emitted during the turning of compost windrows in thermophilic phase. Complementary analysis will be necessary to determine if these indicators can be used for the other emitting activities on composting platforms (screening, shredding, unloading...).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Veolia propreté and Veolia environment research and innovation and to employees at the different composting sites for their help during the sampling campaigns and microbiologic analysis. This work was supported financially by the Languedoc-Roussillon Regional Government Council (France) and the French Agency for Environmental and Energy Management (ADEME) (ADEME, Contract no. 0375C0033).

REFERENCES

- Albrecht, A., Witzemberger, R., Bernzen, U., Jackel, U., 2007. Detection of airborne microbes in a composting facility by cultivation based and cultivation-independent methods. *Ann Agric Environ Med.* 14, 81-85.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
- Fischer, G., Albrecht, A., Jackel, U., Kampfer, P., 2008. Analysis of airborne microorganisms, MVOC and odour in the surrounding of composting facilities and implications for future investigations. *Int J Hyg Environ Health.* 211, 132-142.
- Gorny, R.L., Dutkiewicz, J., Krysinska-Traczyk, E., 1999. Size distribution of bacterial and fungi bioaerosols in indoor air. *Ann. Agr. Env. Med.* 6, 105-113.
- Grisoli, P., Rodolfi, M., Villani, S., Grignani, E., Cottica, D., Berri, A., Picco, A.M., Dacarro, C., 2009. Assessment of airborne microorganism contamination in an industrial area characterized by an open composting facility and a wastewater treatment plant. *Environmental Research.* 109, 135-142.
- Hryhorczuk, D., Curtis, L., Scheff, P., Chung, J., Rizzo, M., Lewis, C., Keys, N., Moomey, M., 2001. Bioaerosol emissions from a suburban yard waste composting facility. *Ann. Agr. Env. Med.* 8, 177-185.
- Kampfer, P., Jureit, C., Albrecht, A., Neef, A., 2002. Immission of microorganisms from composting facilities. In : S. Klammer (Ed.), *Microbiology of composting.*
- Kurup, V.P., Agre, N.S., 1983. Transfer of *Micropolyspora rectivirgula* (Krassilnikov and Agre 1964) Lechevalier, Lechevalier, and Becker 1966 to *Faenia* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 33, 663-665.
- Lacey, J., 1971. *Thermoactinomyces sac-*

- chari sp. nov., a thermophilic actinomycete causing bagassosis. *J Gen Microbiol.* 66, : 327-338.
- Le Goff, O., Bru-Adan, V., Bacheley, H., Godon, J.J., Wery, N., 2010. The microbial signature of aerosols produced during the thermophilic phase of composting. *Journal of Applied Microbiology.* 108, 325-340.
- Matsuo, Y., Katsuta, A., Matsuda, S., Shizuri, Y., Yokota, A., Kasai, H., 2006. *Mechercharimyces mesophilus* gen. nov., sp. nov. and *Mechercharimyces asporophorigenus* sp. nov., antitumour substance-producing marine bacteria, and description of *Thermoactinomycetaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56, 2837-2842.
- Millner, P.D., Bassett, D.A., Marsh, P.B., 1980. Dispersal of *Aspergillus fumigatus* from Sewage Sludge Compost Piles Subjected to Mechanical Agitation in Open Air. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 1000-1009.
- Nikaeen, M., Hatamzadeh, M., Hasanzadeh, A., Sahami, E., Joodan, I., 2009. Bioaerosol emissions arising during application of municipal solid-waste compost. *Aerobiologia.* 25, 1-6.
- Peccia, J., Hernandez, M., 2006. Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science : A review. *Atmos Environ.* 40, 3941.
- Potts, M., 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 58, 755-805.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 1993. *Microbiology.*
- Reinthalder, F.F., Marth, E., Eibel, U., Enayat, U., Feenstra, O., Friedl, H., Kock, M., Pichler-Semmelrock, F.P., Pridnig, G., Schlacher, R., 1997. The assessment of airborne microorganisms in large-scale composting facilities and their immediate surroundings. *Aerobiologia.* 13, 167-175.
- Sánchez-Monedero, M.A., Stentiford, E.I., 2003. Generation and Dispersion of Airborne Microorganisms from Composting Facilities *Trans IChemE.* 81, 166-170.
- Swan, J.R.M., Kelsey, A., Crook, B., Gilbert, E.J., 2003. Occupational and environmental exposure to bioaerosols from composts and potential health effects - A critical review of published data.
- Taha, M.P.M., Drew, G.H., Tamer Vestlund, A., Aldred, D., Longhurst, P.J., Pollard, S.J.T., 2007. Enumerating actinomycetes in compost bioaerosols at source—Use of soil compost agar to address plate ‘masking’. *Atmospheric Environment.* 41, 4759-4765.
- Vanhee, L.M.E., Nelis, H.J., Coenye, T., 2008. Enumeration of airborne bacteria and fungi using solid phase cytometry. *Journal of Microbiological Methods.* 72, 12-19.
- Waksman, S.A., Corke, C.T., 1953. *Thermoactinomyces Tsiklinsky*, a Genus of Thermophilic Actinomycetes. *Journal of Bacteriology.* 66, 377-378.

Troisième partie

Discussion

Le travail réalisé lors de la thèse a permis de caractériser la diversité microbienne des bioaérosols de compostage puis de suivre leur dispersion grâce à des indicateurs spécifiques préalablement identifiés des bioaérosols de compostage lors du retournement des andains en cours de fermentation qui est une étape émissive du procédé. Les différentes étapes ont été réalisées par l'emploi d'outils moléculaires (inventaires moléculaires, PCR quantitative).

Identification moléculaire des bioaérosols de compostage

Un inventaire moléculaire composé de plus de 800 séquences a été effectué sur les bioaérosols émis lors du retournement d'andains sur cinq plates-formes de compostage. Il en ressort une forte diversité bactérienne au sein de ces différents bioaérosols, tandis que pour les champignons, la diversité est plus faible et présente quelques espèces fortement dominantes. Un des sites étudiés, le B, présente à la fois une faible diversité bactérienne et fongique. Une hypothèse pour l'expliquer est que ce site composte uniquement des ordures ménagères tandis que les autres incorporent des déchets verts dans leur procédé.

Les bioaérosols de compostage étudiés sont dominés par deux phyla bactériens qui sont les *Firmicutes* et les *Actinobacteria*. Au sein du compost en cours de fermentation ces deux phyla sont également majoritaires (Blanc et al., 1999, 1997; Dees and Ghiorse, 2001; Herrmann and Shann, 1997; Ryckeboer et al., 2003b; Strom, 1985). Concernant les champignons, le phylum majeur à la fois pour le bioaérosol et pour le compost est celui des *Ascomycota* (Anastasi et al., 2005; Cahyani et al., 2004; Peters et al., 2000; Riachi, 1998; Ryckeboer et al., 2003b; Strom, 1985). Ces similarités entre le compost et les bioaérosols ne sont probablement pas retrouvés au niveau taxonomique inférieur (genres, espèces), certains micro-organismes étant plus favorablement aérosolisés. Cependant peu de données sont disponibles. En effet peu d'études ont effectué des inventaires moléculaires sur les bioaérosols de compostage. Une étude de 2009 sur les bioaérosols émis lors du criblage du compost de déchets verts en phase de maturation a été effectuée (Bru-Adan et al., 2009). Au niveau des phyla bactériens, les *Firmicutes* et les *Actinobacteria* dominent de nouveau par contre au niveau fongique le phylum *Ascomycota* dominant lors de la phase thermophile est remplacé lors de la maturation par le phylum *Basidiomycota*. Les principaux genres bactériens et fongiques sont :

- lors du retournement d'andains en cours de fermentation :
 - pour les bactéries : *Bacillus*, *Geobacillus*, *Planifilum*, *Thermoactinomyces* (*Firmicutes*), *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora* et *Thermobifida* (*Actinobacteria*)
 - pour les champignons : *Thermomyces*, *Aspergillus* et *Penicillium* (*Ascomycota*)
- lors du criblage d'un andain en maturation :
 - pour les bactéries : *Thermobifida* et *Thermoactinomyces*
 - pour les champignons : *Clitocybe* (*Basidiomycota*), *Aspergillus*

Takaku *et al.* ont suivi la succession microbienne au cours du procédé de compostage et il en ressort que lors de la phase de fermentation le phylum *Firmicutes* est dominant puis lors de la phase de maturation, ce phylum disparaît et le phylum *Bacteroidetes* devient dominant (Danon *et al.*, 2008; Takaku *et al.*, 2006; Vaz-Moreira *et al.*, 2007).

Le bioaérosol émis lorsque l'andain est en cours de fermentation est dominé par des espèces thermophiles. Cette dominance au sein du bioaérosol peut être due à la multiplication des espèces thermophiles dans le compost avec une augmentation de la température mais également à la sporulation de certaines espèces thermophiles affiliées aux phyla *Firmicutes* et *Actinobacteria*. Les spores sont plus facilement aérosolisées que les cellules végétatives. Néanmoins, lors de ce travail la présence de spores n'a pas été spécifiquement recherchée. Enfin les inventaires moléculaires ont permis de montrer dans l'aérosol collecté que les micro-organismes qui ont vraisemblablement deux origines différentes : la première est le compost (présence d'espèces thermophile, et/ou d'espèces déjà identifiées dans cet environnement) et la seconde est l'air (présence d'espèces psychrophiles dans l'inventaire *Planococcus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Pedobacter* et *Chryseobacterium* et/ou d'espèces déjà identifiées dans des aérosols).

Les cinq inventaires, collectés sur des plates-formes de compostage traitant différents types de déchets par des procédés différents, ont permis de mettre en évidence une signature microbienne de part la présence de phylotypes communs ("core species") entre les différents bioaérosols émis lors du retournement des andains en phase de fermentation (figure 7.4). Pour les bactéries, un phylotype est commun aux cinq bioaérosols, il est affilié à *Saccharopolyspora rectivirgula* appartenant au phylum *Actinobacteria*. Il représente 7% des séquences bactériennes totales. Les six phylotypes bactériens communs à quatre bioaérosols sont affiliés au phylum des *Firmicutes* (*Planifilum yunnanense*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Thermoactinomyces intermedius* et *Thermoactinomycetaceae sp.*). Les deux autres sont affiliés au phylum des *Actinobacteria* (*Thermobifida fusca* et *Saccharomonospora glauca*).

Pour les champignons, un phylotype est également commun aux cinq bioaérosols, il s'agit de *Thermomyces lanuginosus*, il représente 48% du nombre total des séquences fongiques. Deux phylotypes sont communs à quatre sites, *Penicillium sp.* MG-2007 et *Aspergillus fumigatus* affiliés au phylum *Ascomycota*.

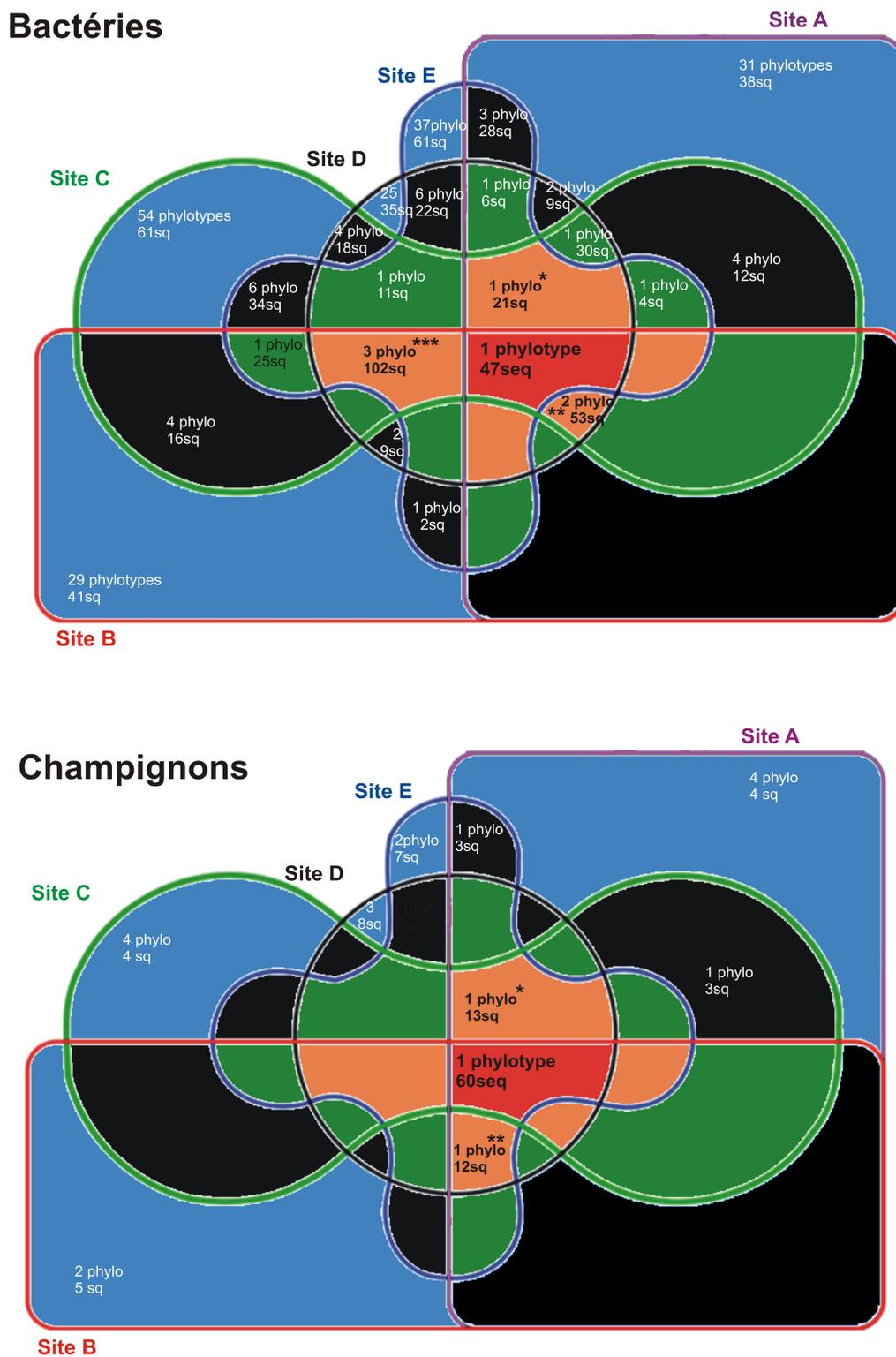


FIGURE 7.4 – Diagramme de Venn indiquant les relations en terme de phylotypes bactériens ou fongiques entre les différents bioaérosols. La première valeur indique le nombre de phylotypes et la seconde valeur le nombre de séquences (sq). Le code couleur utilisé est bleu pour les phylotypes présents dans un seul site; noir pour les communs à deux sites; vert pour les communs à trois sites; orange pour les communs à quatre sites et rouge pour les communs aux cinq sites. Pour les bactéries : * commun à ACDE *Geobacillus thermodenitrificans*; ** commun à ABCD *Saccharomonospora glauca* et *Thermoactinomyces intermedius*; *** commun à BCDE *Thermobifida fusca*, *Planifilum yunnanense* et *Thermoactinomycetaceae sp.*. Pour les champignons : * commun à ACDE *Penicillium sp.* MG-2007; ** commun à BDE *Aspergillus fumigatus*.

La dispersion des bioaérosols de compostage

La dispersion des bioaérosols émis sur les sites industriels est étudiée expérimentalement en déterminant la concentration des micro-organismes dans l'air sur le site (source d'émission) et à distance en se plaçant sous les vents dominants. Les micro-organismes quantifiés pour étudier la dispersion sont les bactéries, les champignons totaux, mais également des groupes microbiens comme les bactéries Gram négatif, les actinomycètes, ou encore *Aspergillus fumigatus* (Albrecht et al., 2007; Clark et al., 1983; Grisoli et al., 2009; Hryhorczuk et al., 2001; Kampf et al., 2002; Millner et al., 1980; Nikaeen et al., 2009; Sanchez-Monedero and Stentiford, 2003). Cependant, ces cibles microbiennes “générales” sont présentes dans de nombreux environnements et ne sont pas spécifiques des bioaérosols de compostage. Certains auteurs suggèrent que les actinomycètes thermophiles et les champignons thermophiles peuvent être des indicateurs pour suivre la dispersion des bioaérosols de compostage (Albrecht et al., 2008; Fischer et al., 2008; Kampf et al., 2002). Les genres thermophiles *Saccharomonospora* et *Thermoactinomyces* ont été proposés comme indicateurs pour suivre la dispersion des bioaérosols aux alentours des plates-formes de compostage (Neef et al., 2003).

Notre objectif était de définir des indicateurs de l'origine “compost” dans l'air afin de tracer spécifiquement les bioaérosols de compostage au sein de la flore microbienne aéroportée. Le choix des micro-organismes a été effectué au sein des “core species” définies dans la première partie de la thèse, et ce en fonction de différents critères :

- l'espèce doit être thermophile,
- l'espèce doit déjà avoir été identifiée dans l'environnement “compost”,
- l'espèce doit être présente dans les cinq bioaérosols étudiés.

Au sein des “core species”, deux phylotypes répondent à ces différents critères, il s'agit pour les bactéries du phylotype NA07 affilié à l'espèce *Saccharopolyspora rectivirgula* et pour les champignons du phylotype EQ05 affilié à *Thermomyces lanuginosus*. Un autre phylotype bactérien, NC38, a été également retenu bien qu'il n'ait été identifié que dans quatre des cinq bioaérosols. Ce phylotype affilié à la famille des *Thermoactinomycetaceae* a un faible pourcentage de similarité avec les séquences d'ADNr 16S disponibles dans la base de données NCBI. Ceci indique que ce phylotype a été peu retrouvé dans l'environnement en général (environnement aquatique, sol, végétaux . . .) et donc qu'il pourrait être spécifique d'un environnement particulier : le compost. Les résultats de Partanen *et al.* et Yamada *et al.* confortent cette hypothèse. Ils ont identifiés une séquence proche de celle de NC38 dans un compost en phase de fermentation d'une part (Partanen et al., 2010) et dans du compost en cours de maturation d'autre part (Yamada et al., 2008).

L'espèce *Saccharopolyspora rectivirgula* est affiliée au phylum *Actinobacteria*. C'est une espèce aérobie, thermophile (37°C – 50°C – 63°C). Elle a été isolée dans des environnements thermophiles (foin, compost) (Ranalli et al., 1999). Cette espèce est connue comme pouvant engendrer une hypersensibilité pulmonaire (Duchaine et al., 1999).

La famille des *Thermoactinomycetaceae* appartenant au phylum des *Firmicutes* a été identifiée dans des environnements thermophiles : le foin, le compost (Partanen et al., 2010; Prescott et al., 1993; Yamada et al., 2008). La famille des *Thermoactinomycetaceae* est connue comme pouvant être responsable d'hypersensibilité pulmonaire (Lacey, 1989).

L'espèce fongique *Thermomyces lanuginosus* issue du phylum *Ascomycota* a également été identifiée dans le compost (Singh et al., 2003). C'est une espèce thermophile, sa température de croissance est comprise entre 30 et 60°C avec un optimum à 50°C.

Pour les trois phylotypes, NA07, NC38 et EQ05, un système de détection de type TaqMan par PCR quantitative a été construit à partir des séquences d'ADNr 16S ou 18S. La PCR quantitative a été choisie car contrairement aux techniques culturales habituellement employées, elle permet de quantifier la fraction bactérienne non cultivable, majoritaire dans les bioaérosols. Ces trois systèmes de détection mis au point ont permis de déterminer la concentration des indicateurs au sein du bioaérosol émis lors des activités de retournement des andains et également dans des environnements non soumis à l'influence des plates-formes de compostage.

La concentration des différents indicateurs est plus faible dans les environnements naturels que lors d'une activité de retournement de compost, la différence étant comprise entre 1 et 5 unités logarithmiques pour les indicateurs bactériens et de l'ordre de 1 à 3 unités logarithmiques pour l'indicateur fongique. La concentration de l'indicateur fongique est variable au sein des environnements naturels. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'émission des spores fongiques dans l'air dépend de nombreux facteurs, notamment des conditions météorologiques, ou de la saison (Herrero et al., 2006; Li and Kendrick, 1994; Stepalska and Wolek, 2009). Les augmentations de concentration des trois phylotypes étudiés, comparativement à leur niveau "naturel" dans l'air, observées lors du retournement d'andains sur les plates-formes de compostage permettent de les valider comme indicateurs de bioaérosols de compostage pour cette activité et de les utiliser pour l'analyse de la dispersion autour des sites.

Les résultats montrent que la concentration des indicateurs présents dans les bioaérosols de compostage émis lors du retournement d'andains en cours de fermentation diminue avec la distance à la source et revient au niveau du bruit de fond de l'air aux alentours de 200 m en aval (sous le vent) de la source d'émission. Malgré la variabilité observée due notamment aux conditions météorologiques et à des niveaux d'émissions différents, la tendance générale concernant la dispersion est que jusqu'à 50 m en aval de la source, il y a systématiquement un impact des bioaérosols et qu'à 100 m, un impact est fréquent. Dans cette étude, les points à 50 m correspondent à des prélèvements effectués dans le périmètre des plates-formes. Au delà de 200 m, un impact des bioaérosols de compostage est observé uniquement lorsque le niveau d'émission à la source est important et pour des vents supérieurs à 3 m s⁻¹.

Les indicateurs se dispersent de manières différentes. Par ailleurs, les différences de dispersion observées entre les trois indicateurs peuvent être due à leurs caractéristiques

intrinsèques. L'espèce *Saccharopolyspora rectivirgula* est une espèce sporulante (formation de type basispétal). Le nombre de spores produit varie entre 2 et 15 pour un diamètre compris entre 0,7 et 1,5 μm (Kurup and Agre, 1983). La famille des *Thermoactinomyce-taceae* n'émet qu'une seule spore (Matsuo et al., 2006; Waksman and Corke, 1953), d'un diamètre compris entre 0,8 et 1,5 μm (Prescott et al., 1993; Waksman and Corke, 1953).

Le phylotype fongique EQ05 est affilié à *Thermomyces lanuginosus* (*Ascomycota*). La taille des spores est plus grosse que celle des bactéries.

Les différences du nombre, du diamètre et du type de spores produites ont une incidence sur le niveau d'émission au sein du compost et également sur la dispersion.

De manière générale, à la vue des résultats un seul indicateur n'est pas suffisant pour montrer la dispersion des bioaérosols de compostage. En couplant les différents indicateurs, une meilleure vision est obtenue.

Les niveaux d'émission des bioaérosols dans l'air dépendent des caractéristiques du compost (déchets, densité, humidité...) et du procédé (technologie de retournement, de criblage...).

La dispersion des bioaérosols est influencée par les conditions météorologiques (vent, humidité). Un autre facteur influençant la dispersion est sa granulométrie. En effet les micro-organismes peuvent être sous différentes formes dans l'air : cellules uniques ; spores ; des agrégats de cellules ; agglomérés ou non à la matière particulaire (Gorny et al., 1999).

Quelques auteurs se sont intéressés à l'association entre les bactéries aérosolisées et les particules (Huffman et al., 2010; Lighthart, 1997; Matthias-Maser and Jaenicke, 1995; Shaffer and Lighthart, 1997). Lighthart a observé que la gamme des particules associées aux micro-organismes étaient comprise entre 0,65 et 7 μm , exprimée en diamètre aérodynamique. Il a montré que les bactéries dans l'air étaient plus présentes en agrégats (95%) que sous forme libre. La taille des agrégats est variable selon l'origine du bioaérosol (un bioaérosol ayant une origine océanique a un diamètre aérodynamique médian de 2,4 μm , tandis qu'un bioaérosol terrigène présente un diamètre médian aux alentours de 4 μm) (Shaffer and Lighthart, 1997). Plus les particules ont un diamètre élevé moins elles se disperseront.

Sur les plates-formes de compostage la taille des particules générées par les activités de compostage est variable. La concentration en particules est la plus élevée pour des tailles comprises entre 0,30 et 0,665 μm . Elle est aux alentours de 1×10^8 particules m^{-3} . Selon l'activité (le retournement, le criblage, le broyage) et la phase du compost (fermentation, maturation), la concentration en fonction des différences tailles granulométriques varie. Lors du criblage d'un compost en cours de maturation, la concentration des particules ayant un diamètre de 4 μm varie et atteint 1×10^8 particules m^{-3} (Gauzere, 2008).

Conclusions et perspectives

Cette étude a permis :

- d'améliorer la connaissance de la diversité bactérienne et fongique des bioaérosols de compostage émis lors du retournement d'andains en cours de fermentation
- de montrer qu'il existait une signature microbienne au niveau des bioaérosols émis lors du retournement pour les différentes plates-formes de compostage étudiées traitant divers types de déchets
- de définir, en se basant sur cette signature, des indicateurs spécifiques aux bioaérosols de compostage émis lors du retournement d'andains en cours de fermentation
- de concevoir trois systèmes de détection (deux bactériens et un fongique) pour la PCR quantitative permettant de quantifier les indicateurs rapidement
- d'avoir des outils moléculaires pour étudier les bioaérosols de compostage émis lors du retournement des andains en cours de fermentation : la SSCP et les indicateurs.
- de mieux appréhender la dispersion autour des plates-formes de compostage de manière spécifique en employant les indicateurs conçus

A la suite de ce travail et des résultats obtenus, des perspectives peuvent être envisagées :

- Il serait nécessaire de valider, les indicateurs développés ici pour l'activité de retournement d'andain en phase de fermentation en les quantifiant dans les autres étapes émettrices du procédé (broyage, criblage). Suivant les résultats, ils représenteront l'ensemble des activités de compostage d'une plate-forme, ou pourront être couplés à d'autres indicateurs spécifiques d'autres phases.
- Il faudrait affiner l'évaluation de la concentration des indicateurs dans l'environnement naturel (non soumis aux activités de compostage) qui représente le bruit de fond de l'air.
- Il serait intéressant d'approfondir l'étude des déterminants de la composition des bioaérosols de compostage et des niveaux d'émissions (type de déchets, procédé de compostage, âge de l'andain . . .)
- Au delà des études de dispersion, les indicateurs développés pourraient également servir à indiquer si en un point donné, à une certaine distance d'un site, il y a un impact ou si la concentration mesurée correspond à celle du bruit de fond de l'air
- Les données de dispersion obtenues et à venir pourraient être utilisées pour la construction d'un modèle de dispersion des bioaérosols de compostage.

Quatrième partie

Références bibliographiques

Bibliographie

- ADEME (2002). Enquete sur les installations de traitements des dechets menagers et assimilés en 2002 (itom2002). Technical report, ADEME.
- ADEME (2008). Le traitement des ordures ménagères en france en 2008 (itom 2008). Technical report, ADEME.
- Adhikari, A., Reponen, T., Grinshpun, S. A., Martuzevicius, D., and LeMasters, G. (2006). Correlation of ambient inhalable bioaerosols with particulate matter and ozone : A two-year study. Environmental Pollution, 140(1) :16–28.
- Agogue, H., Joux, F., Obernosterer, I., and Lebaron, P. (2005). Resistance of marine bacterioneuston to solar radiation. Appl. Environ. Microbiol., 71(9) :5282–5289.
- Aintablian, N. and Walpita, P. and Sawyer, M. . (1998). Detection of bordetella pertussis and respiratory syncytial virus in air samples from hospital rooms. Infection Control and Hospital Epidemiology, 19 :918–923.
- Albrecht, A., Fischer, G., Brunnemann-Stubbe, G., Jackel, U., and Kampfer, P. (2008). Recommendations for study design and sampling strategies for airborne microorganisms, mvoc and odours in the surrounding of composting facilities. Int. J. Hyg. Environ. Health, 211 :121–131.
- Albrecht, A., Witzemberger, R., Bernzen, U., and Jackel, U. (2007). Detection of airborne microbes in a composting facility by cultivation based and cultivation-independent methods. Ann Agric Environ Med, 14(1) :81–5.
- Alfreider, A., Peters, S., Tebbe, C., Rangger, A., and Insam, H. (2002). Microbial community dynamics during composting of organic matter as determined by 16s ribosomal dna analysis. Compost science and utilization, 10 :303–312.
- Aller, J. Y., Kuznetsova, M. R., Jahns, C. J., and Kemp, P. F. (2005). The sea surface microlayer as a source of viral and bacterial enrichment in marine aerosols. Journal of Aerosol Science, 36(5-6) :801–812.

- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., and Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. J Mol Biol, 215 :403–410.
- Amann, R., Binder, B., Olson, R., Chisholm, S., Devreux, R., and Stahl, D. (1990). Combination of 16s rdna target oligonucleotide probes with a flow cytometry for analyzing mixing microbial population. Appl Environ Microbiol, 56 :1919–1925.
- Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev., 59(1) :143–169.
- Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Laj, P., Mailhot, G., and Delort, A. M. (2006). Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the puy de dome : major groups and growth abilities at low temperatures. FEMS Microbiol Ecol, 59(2) :242–54.
- Amato, P., Parazols, M., Sancelme, M., Mailhot, G., Laj, P., and Delort, A.-M. (2007). An important oceanic source of micro-organisms for cloud water at the puy de dome (france). Atmospheric Environment, 41(37) :8253–8263.
- Amir, S., Merlina, G., Pinelli, E., Winterton, P., Revel, J. C., and Hafidi, M. (2008). Microbial community dynamics during composting of sewage sludge and straw studied through phospholipid and neutral lipid analysis. Journal of Hazardous Materials, 159 :593–601.
- Anastasi, A., Varese, G. C., and Marchisio, V. F. (2005). Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. Mycologia, 97(1) :33–44.
- Andersen, G. (1958). New sampler for the collection, sizing and enumeration of viable airborne particles. J. B., 76 :481–484.
- Angenent, L. T., Kelley, S. T., St Amand, A., Pace, N. R., and Hernandez, M. T. (2005). Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool. Proc Natl Acad Sci U S A, 102(13) :4860–5.
- Aussel, H., Le Bacle, C., Dormier, G., and Galtier, Y. (2004). Le point des connaissances sur le traitement des eaux usées. INRS travail et santé, pages 1–4.
- Bartlett, M.S. and Durant, P. S. M. S. J. T. X. L. B. e. a. (1997). Detection of pneumocystis carinii dna in air samples : Likely environmental risk to susceptible persons. Journal of Clinical Microbiology, 35 :2511–2513.
- Bauer, H., Kasper-Giebl, A., Loflund, M., Giebl, H., Hitzenberger, R., Zibuschka, F., and Puxbaum, H. (2002). The contribution of bacteria and fungal spores to the organic carbon content of cloud water, precipitation and aerosols. Atmospheric Research, 64 :109–119.

- Beck-Friis, B., Pell, M., Sonesson, U., Jansson, H., and Kirchmann, H. (2000). Formation and emission of n₂o and ch₄ from compost heaps of organic household waste. Environmental Monitoring and Assessment, 62 :317–331.
- Beffa, T., Staib, F., Lott Fischer, J., Lyon, P. F., Gumowski, P., Marfenina, O. E., Dunoyer-Geindre, S., Georgen, F., Roch-Susuki, R., Gallaz, L., and Latge, J. P. (1998). Mycological control and surveillance of biological waste and compost. Med Mycol, 36 Suppl 1 :137–45.
- Blanc, M., Marilley, L., Beffa, T., and Aragno, M. (1997). Rapid identification of heterotrophic, thermophilic, spore-forming bacteria isolated from hot composts. International Journal of Systematic Bacteriology, 47 :1246–1248.
- Blanc, M., Marilley, L., Beffa, T., and Aragno, M. (1999). Thermophilic bacterial communities in hot composts as revealed by most probable number counts and molecular (16s rDNA) methods. FEMS Microbiol Ecol, 28 :141–149.
- Blanchard, D. and Syzdek, L. (1982). Water-to-air transfer and enrichment of bacteria in drops from bursting bubbles. Appl Environ Microbiol., 43 :1001–1005.
- Bligh, C. and Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Physiol. Pharmacol. 3, 37 :911–917.
- Bourdin-korsakissok, I. (2009). Changements de chelle en modlisation de la qualite de lair et estimation des incertitudes associees. Master's thesis, ENPC ParisTech.
- Bouزيد, S. (2005). Validation du modèle global gocart de nasa et son apport à l'étude des variations mensuelles des phénomènes de sable sur le sahara algerien. Memoire de master en sciences et technologies de l'espace option : Météorologie spatiale et climat mondial, Centre Régional Africain des Sciences et Technologies de l'Espace en Langue Francaise.
- Bovallius, A., Bucht, B., Roffey, R., and Anas, P. (1978). Three-year investigation of the natural airborne bacterial flora at four localities in sweden. Appl. Environ. Microbiol., 35 :847–852.
- Bowers, R. M., Lauber, C. L., Wiedinmyer, C., Hamady, M., Hallar, A. G., Fall, R., Knight, R., and Fierer, N. (2009). Characterization of airborne microbial communities at a high-elevation site and their potential to act as atmospheric ice nuclei. Appl. Environ. Microbiol., 75 :5121–5130.
- Brandi, G., Sisti, M., and Amagliani, G. (2000). Evaluation of the environmental impact of microbial aerosols generated by wastewater treatment plants utilizing different aeration systems. Journal of Applied Microbiology, 88 :845–852.

- Brasel, T. L., Douglas, D. R., Wilson, S. C., and Straus, D. C. (2005). Detection of airborne stachybotrys chartarum macrocyclic trichothecene mycotoxins on particulates smaller than conidia. Appl. Environ. Microbiol., 71 :114–122.
- Brodie, E. L., DeSantis, T. Z., Moberg Parker, J. P., Zubietta, I. X., Piceno, Y. M., and Andersen, G. L. (2007). Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. PNAS, 104 :299–304.
- Brooks, J., Tanner, B. D., Gerba, C. P., Haas, C. N., and Pepper, I. L. (2005a). Estimation of bioaerosol risk of infection to residents adjacent to a land applied biosolids site using an empirically derived transport model. Journal of Applied Microbiology, 98 :397–405.
- Brooks, J. P., Gerba, C. P., and Pepper, I. L. (2007). Diversity of aerosolized bacteria during land application of biosolids. Journal of Applied Microbiology, 103 :1779–1790.
- Brooks, J. P., Tanner, B. D., Josephson, K. L., Gerba, C. P., Haas, C. N., and Pepper, I. L. (2005b). A national study on the residential impact of biological aerosols from the land application of biosolids. Journal of Applied Microbiology, 99 :310–322.
- Brown, J. (1997). Airborne inoculum. In Brown, J. and Ogle, H., editors, Plant Pathogens and Plant Diseases.
- Browne, M. L., Ju, C. L., Recer, G. M., Kallenbach, L. R., Melius, J. M., and Horn, E. G. (2001). A prospective study of health symptoms and aspergillus fumigatus spore counts near a grass and leaf composting facility. Compost Science & Utilization, 9 :241–249.
- Bru-Adan, V., Wery, N., Moletta, M., Boiron, P., Delgenes, J., and Godon, J. J. (2009). Diversity of bacteria and fungi in aerosols during screening in a green waste composting plant. Curr Microbiol, 59 :326–335.
- Bunger, J., Antlauf-Lammers, M., Schulz, T. G., Westphal, G. A., Muller, M. M., Ruhnau, P., and Hallier, E. (2000a). Health complaints and immunological markers of exposure to bioaerosols among biowaste collectors and compost workers. Occupational and Environmental Medicine, 57 :458–464.
- Bunger, J., Ruhnau, P., Gruner, C., Bittighofer, P., Antlauf-Lammers, M., Pethran, A., Paduch, S., and Hallier, E. (2000b). Specific ige antibodies against actinomycetes and moulds as biomarkers of exposure to bioaerosols. Arbeitsmedizin Sozialmedizin Umweltmedizin, 35 :270–273.
- Bunger, J., Schappler-Scheele, B., Hilgers, R., and Hallier, E. (2007). A 5-year follow-up study on respiratory disorders and lung function in workers exposed to organic dust from composting plants. Int Arch Occup Environ Health, 80 :306–312.
- Burch, Burch, M., Levetin, and Levetin, E. (2002). Effects of meteorological conditions on spore plumes. International Journal of Biometeorology, 46 :107–117.

- Burge, H. A. (1986). Some comments on the aerobiology of fungus spores. Grana, 25 :143 – 146.
- Burger, S. R. and Bennett, J. W. (1985). Droplet enrichment factors of pigmented and nonpigmented *Serratia marcescens* : possible selective function for prodigiosin. Appl. Environ. Microbiol., 50 :487–490.
- Burrows, S. M., Butler, T., Jockel, P., Tost, H., Kerckweg, A., Poschl, U., and Lawrence, M. G. (2009a). Bacteria in the global atmosphere part 2 : Modeling of emissions and transport between different ecosystems. Atmos. Chem. Phys., 9 :9281–9297.
- Burrows, S. M., Elbert, W., Lawrence, M. G., and Poschl, U. (2009b). Bacteria in the global atmosphere part 1 : Review and synthesis of literature data for different ecosystems. Atmos. Chem. Phys., 9 :9263–9280.
- Cahyani, V. R., Matsuya, K., Asakawa, S., and Kimura, M. (2004). Succession and phylogenetic profile of eukaryotic communities in the composting process of rice straw estimated by pcr-dgge analysis. Biol Fertil Soils, 40 :334–344.
- Chataigné, G. (2007). Determination structurale des lipopolysaccharides de surface chez Sinorhizobium. PhD thesis, Université Paul Sabatier, Toulouse.
- Chen, C.C., a. Y. T., Chang, J., Chang, C., Shih, T., and Hwang, J. (1998). A computer simulation study on bioaerosol colony counting error due to masking effect. The Annals of Occupational Hygiene, 42 :501–510.
- Chew, G. L., Douwes, J., Doekes, G., Higgins, K. M., Van Strien, R., Spithoven, J., and Brunekreef, B. (2001). Fungal extracellular polysaccharides,(13)-glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust. Indoor Air, 11 :171–178.
- Chintalapati, S., Kiran, M., and Shivaji, S. (2004). Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation. Cellular and Molecular Biology, 50 :631–642.
- Cho, B. and Azam, F. (1990). Biogeochemical significance of bacterial biomass in the ocean's euphotic zone. Mar. Ecol.-Prog. Ser., 63 :253–259.
- Choi and Park (2002). The influence of yeast on thermophilic composting of food waste. Lett Appl Microbiol, 26 :175–178.
- Chung, Y. (2007). Evaluation of gas removal and bacterial community diversity in a biofilter developed to treat composting exhaust gases. Journal of Hazardous Materials, 144 :377–385.
- Clark, C. S., Rylander, R., and Larsson, L. (1983). Levels of gram-negative bacteria, *Aspergillus fumigatus*, dust, and endotoxin at compost plants. Appl. Environ. Microbiol., 45 :1501–1505.

- Cleland, D., Krader, P., McCree, C., Tang, J., and Emerson, D. (2004). Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. Journal of Microbiological Methods, 58(1) :31–38.
- Cloutier, Y. (2007). Bioaérosols (quelques principes). In Atelier de travail sur la protection respiratoire contre les bioaérosols.
- Cobb, N., Sullivan, P., and Etzel, R. (1995). Pilot study of health complaints associated with commercial processing of mushroom compost in southeastern pennsylvania. J Agromedicine, 2(2) :13–25.
- Corre, E. (2000). Approches moléculaires de la diversité microbienne de deux environnements extrêmes : les sources hydrothermales profondes et les réservoirs pétroliers. PhD thesis, Université de Brest.
- Cox, C. and Wathes, C. (1995). Bioaerosol handbooks, chapter Particule size analyzers : practical procedures and labotory techniques, pages 177–246.
- CSHPF (2006). Contamination fongique en milieux intérieurs, diagnostic, effets sur la santé respiratoire, conduites á tenir. Technical report, Conseil supérieur d’hygiène publique de France.
- CSTB (2006). Synthèse bibliographique sur les méthodes de mesure des aérosols de legionelles. Technical report, CSTB.
- Danon, M., Franke-Whittle, I. H., Insam, H., Chen, Y., and Hadar, Y. (2008). Molecular analysis of bacterial community succession during prolonged compost curing. FEMS Microbiol Ecol, 65 :133–144.
- De Bertoldi, M. (1993). Biology of composting. Waste Management and research, 1 :57–76.
- De Lucca, A. J. (2007). Harmful fungi in both agriculture and medicine. Rev Iberoam Micol, 24 :3–13.
- Dees, P. M. and Ghiorse, W. C. (2001). Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by pcr-amplified rrna sequences from cultivated isolates and extracted dna. FEMS Microbiol Ecol, 35 :207–216.
- Delaunay, N. (1997). Une approche du risque microbiologique aéroporté dans une station de compostage industriel d’ordures ménagères. PhD thesis, These de doctorat en médecine, Grenoble.
- Deloraine, A., Hedreville, L., Arthus, C., Bajeat, P., and Deportes, I. (2002). Etude bibliographique sur l’évaluation des risques liés aux bioaérosols générés par le compostage des déchets. Rapport, ADEME, CAREPS, Angers, Grenoble.

- Deportes, I., Benoit-Guyed, J., and Zmiroub, D. (1995). Hazard to man and the environment posed by the use of urban waste compost : a review. The Science of the Total Environment, 172 :197–222.
- DeSantis, T., Brodie, E., Moberg, J., Zubietta, I., Piceno, Y., and Andersen, G. (2007). High-density universal 16s rRNA microarray analysis reveals broader diversity than typical clone library when sampling the environment. Microbial Ecology, 53 :371–383.
- Despres, V. R., Nowoisky, J. F., Klose, M., Conrad, R., Andreae, M. O., and Poschl, U. (2007). Characterization of primary biogenic aerosol particles in urban, rural, and high-alpine air by DNA sequence and restriction fragment analysis of ribosomal RNA genes. Biogeosciences, 4(6) :1127–1141.
- Douwes, J., Heederik, D., Douwes, J., Pearce, N., and Thorne, P. (2003). Bioaerosol health effects and exposure assessment : Progress and prospects. Ann Occup Hyg, 47(3) :187–200.
- Douwes, J. and Wouters, I. (2000). Upper airway inflammation assessed by nasal lavage in compost workers : A relation with bio-aerosol exposure. American Journal of Industrial Medicine, 37(5) :459–468.
- Droffner, M., Brinton, W., and Evans, E. (1995). Evidence for the prominence of well characterized mesophilic bacteria in thermophilic (50-70°C) composting environment. Biomass and Energy, 8 :991–195.
- Duchaine, C., Meriaux, A., Brochu, G., Bernard, K., and Cormier, Y. (1999). *Saccharopolyspora rectivirgula* from Quebec dairy barns : application of simplified criteria for the identification of an agent responsible for farmer's lung disease. J Med Microbiol, 48(2) :173–180.
- Duchaine, C. and Meriaux, A. and Thorne, P. C. Y. (2000). Assessment of particulates and bioaerosols in eastern Canadian sawmills. American Industrial Hygiene Association Journal, 61 :727–732.
- Duguid, J. P. (1946). The size and the duration of air-carriage of respiratory droplets and droplet-nuclei. Journal of Hygiene, 44 :471–479.
- Duquenne, P. and Greff-Mirguet, G. (2005). L'échantillonnage et l'analyse des aérosols microbiens. Technical report, INERIS.
- Eduard, W. (1993). Assessment of mould spore exposure and relations to symptoms in wood trimmers. Proefschrift Wageningen, Eduard, [S.l.]. PhD thesis Wageningen University dissertation no. 1608 Wageningen UR Library.

- Elbert, W., Taylor, P. E., Andreae, M. O., and Poschl, U. (2007). Contribution of fungi to primary biogenic aerosols in the atmosphere : wet and dry discharged spores, carbohydrates, and inorganic ions. Atmospheric Chemistry and Physics, 7 :4569–4588.
- Fahlgren, C., Hagstrom, A., Nilsson, D., and Zweifel, U. L. (2010). Annual variations in the diversity, viability, and origin of airborne bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 76 :3015–3025.
- FAO (1988). Manuel de fixation des dunes. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome, cahier fao conservation 18 edition.
- Farnleitner, A., Kreuzinger, N., Kavka, G., Grillenberger, S., Rath, J., and Mach, R. (2000). Comparative analysis of denaturing gradient gel electrophoresis and temporal temperature gradient gel electrophoresis in separating escherichia coli uida amplicons differing in single base substitutions. Lett Appl Microbiol, 30 :427–431.
- Feller, G. and Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes : hot topics in cold adaptation. Nat Rev Micro, 1 :200–208.
- Fierer, N., Liu, Z., Rodriguez-Hernandez, M., Knight, R., Henn, M., and Hernandez, M. T. (2008). Short-term temporal variability in airborne bacterial and fungal populations. Appl. Environ. Microbiol., 74 :200–207.
- Fischer, G., Albrecht, A., Jackel, U., and Kampfer, P. (2008). Analysis of airborne microorganisms, mvoc and odour in the surrounding of composting facilities and implications for future investigations. Int J Hyg Environ Health, 211(1-2) :132–42.
- Fisher, M. and Triplett, E. (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. Appl. Environ. Microbiol., 65 :4630–4636.
- Fogarty, A. M. and Tuovinen, O. H. (1991). Microbiological degradation of pesticides in yard waste composting. Microbiol Mol Biol Rev, 55 :225–233.
- Fong, N. J. C., Burgess, M. L., Barrow, K. D., and Glenn, D. R. (2001). Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium arthrobacter agilis in response to thermal and salt stress. Applied Microbiology and Biotechnology, 56 :750–756.
- Fracchia, L., Pietronave, S., Rinaldi, M., and Martinotti, M. (2006a). Site-related airborne biological hazard and seasonal variations in two wastewater treatment plants. Water Research, 40 :1985–1994.
- Fracchia, L., Pietronave, S., Rinaldi, M., and Martinotti, M. G. (2006b). The assessment of airborne bacterial contamination in three composting plants revealed site-related biological hazard and seasonal variations. J Appl Microbiol, 100(5) :973–84.

- Francou, C. (2003). Stabilisation de la matière organique au cours du compostage de déchets urbains : Influence de la nature des déchets et du procédé de compostage - Recherche d'indicateurs pertinents. PhD thesis, Ecole doctorale ABIES.
- Frohlich-Nowoisky, J., Pickersgill, D. A., Despres, V. R., and Poschl, U. (2009). High diversity of fungi in air particulate matter. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(31) :12814–12819.
- Fulton, J. (1966a). Microorganisms of the upper atmosphere iii. relationship between altitude and micropopulation. Appl Environ Microbiol, 14 :237–240.
- Fulton, J. (1966b). Microorganisms of the upper atmosphere : Iv. microorganisms of a land air mass as it traverses an ocean. Appl Environ Microbiol, 14 :241–244.
- Fulton, J. (1966c). Microorganisms of the upper atmosphere v. relationship between frontal activity and the micropopulation at altitude,. Appl Environ Microbiol, 14 :245–250.
- Fulton, J. and Mitchell, R. (1966). Microorganisms of the upper atmosphere ii. microorganisms in two types of air masses at 690 meters over a city. Appl Environ Microbiol, 14 :232–236.
- Gauzere, C. (2008). Caractérisation de la microflore aéroportée des sites de compostage. Master's thesis, Université de Pau et des Pays de l'Adour.
- Georlette, D., Blaise, V., Collins, T., Amico, S. D., Gratia, E., Hoyoux, A., Marx, J. C., Sonan, G., Feller, G., and Gerday, C. (2004). Some like it cold : biocatalysis at low temperatures. FEMS Microbiology Reviews, 28(1) :25–42.
- Gery, I., Kruger, J., and Spiesel, S. Z. (1972). Stimulation of b-lymphocytes by endotoxin : Reactions of thymus-deprived mice and karyotypic analysis of dividing cells in mice bearing t6t6 thymus grafts. J Immunol, 108 :1088–1091.
- Gilbert, Y. and Duchaine, C. (2009). Bioaerosols in industrial environments : a review. Can. J. Civ. Eng., 36 :1873–1886.
- Godon, J. J., Duthoit, F., Delbès, C., Millet, L., and Montel, M. (2001). Utilisation d'une technique d'empreinte moléculaire dans l'étude d'écosystèmes microbiens complexes. application à la fabrication d'un fromage au lait cru l'aoc salers. Lait, 81 :257–262.
- Godon, J. J. and Zumstein, E. (1997). Microbial 16s rdna diversity in an anaerobic digester. Water Science and Technology, 36 :49–55.
- Godwin, C. and Batterman, S. (2007). Indoor air quality in michigan schools. Indoor Air, 17 :109–121.

- Gora, A., Mackiewicz, B., Krawczyk, P., Golec, M., Skorska, C., Sitkowska, J., Cholewa, G., Larsson, L., Jarosz, M., Wojcik-Fatla, A., and Dutkiewicz, J. (2009). Occupational exposure to organic dust, microorganisms, endotoxin and peptidoglycan among plants processing workers in poland. Ann Agric Environ Med, 16 :143–150.
- Gorny, R., Szponar, B. and Larsson, L., Pehrson, C. and Prazmo, Z., and Dutkiewicz, J. (2004). Metalworking fluid bioaerosols at selected workplaces in a steelworks. American Journal of Industrial Medicine, 46 :400.
- Graumann, P. L. and Marahiel, M. A. (1998). A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. Trends in Biochemical Sciences, 23 :286–290.
- Greff-Mirguet, G. (2002). Echantillonnage et analyse des endotoxines dans l'air. INRS Cahiers de notes documentaires Hygiène et sécurité du travail, pages 73–87.
- Griffin, D. W., Kubilay, N., Kocak, M., Gray, M. A., Borden, T. C., and Shinn, E. A. (2007). Airborne desert dust and aeromicrobiology over the turkish mediterranean coastline. Atmospheric Environment, 41 :4050–4062.
- Grimi, A., Zender, C. S., and Colarco, P. R. (2002). Saltation sandblasting behavior during mineral dust aerosol production. Geophys. Res. Lett., 29 :1868.
- Grinshpun, S. A., Adhikari, A., Cho, S. H., Kim, K. Y., Lee, T., and Reponen, T. (2007). A small change in the design of a slit bioaerosol impactor significantly improves its collection characteristics. J Environ Monit, 9 :855–61.
- Grisoli, P., Rodolfi, M., Villani, S., Grignani, E., Cottica, D., Berri, A., Picco, A. M., and Dacarro, C. (2009). Assessment of airborne microorganism contamination in an industrial area characterized by an open composting facility and a wastewater treatment plant. Environmental Research, 109(2) :135–142.
- Harrison, R. M., Jones, A. M., Biggins, P. D. E., Pomeroy, N., Cox, C. S., Kidd, S. P., Hobman, J. L., Brown, N. L., and Beswick, A. (2005). Climate factors influencing bacterial count in background air samples. International Journal of Biometeorology, 49 :167–178.
- Hassen, A., Belguith, K., Jedidi, N., Cherif, A., Cherif, M., and Boudabous, A. (2001). Microbial characterization during composting of municipal solid waste. Bioresource Technology, 80 :217–225.
- Hayashi, K. (2002). Pcr-sscp : a simple and sensitive method for the detection of mutations in genomic dna. PCR methods Applic, 1 :34–38.
- He, Y., Inamori, Y., Mizuochi, M., Kong, H., Iwami, N., and Sun, T. (2000). Measurements of n₂o and ch₄ from the aerated composting of food waste. The Science of The Total Environment, 254(1) :65–74.

- Heidelberg, J., Shahamat, M. ., Levin, M., Rahman, I., Stelma, G., Grim, C., and Colwell, R. (1997). Effect of aerosolization on culturability and viability of gram- negative bacteria. Appl Environ Microbiol, 63 :3585–3588.
- Heinonen-Tanski, H., Reponen, T., and Koivunen, J. (2009). Airborne enteric coliphages and bacteria in sewage treatment plants. Water Research, 43(9) :2558–2566.
- Hejkal, T. and Laraock, P. W. J. (1980). Water-to-air fractionation of bacteria. Appl Environ Microbiol, 39 :335–338.
- Herr, C. E. W., Nieden, A., Jankofsky, M., Stilianakis, N. I., Boedeker, R.-H., and Eikmann, T. F. (2003). Effects of bioaerosol polluted outdoor air on airways of residents : a cross sectional study. Occup. Environ. Med., 60 :336–342.
- Herrera, M. L., Vallor, A. C., Gelfond, J. A., Patterson, T. F., and Wickes, B. L. (2009). Strain-dependent variation in 18s ribosomal dna copy numbers in aspergillus fumigatus. Journal of Clinical Microbiology, 47(5) :1325–1332.
- Herrero, A., Ruiz, S., Bustillo, M., and Morales, P. (2006). Study of airborne fungal spores in madrid, spain. Aerobiologia, 22(2) :133–140.
- Herrmann, R. F. and Shann, J. F. (1997). Microbial community changes during the composting of municipal solid waste. Microbial Ecology, 33 :78–85.
- Hours, M. (2003). Etat des connaissances sur les micro-organismes dans la filière déchets. Technical report, Rapport Réseau Santé Déchets.
- Hryhorczuk, D., Curtis, L., Scheff, P., Chung, J., Rizzo, M., Lewis, C., Keys, N., and Moomey, M. (2001). Bioaerosol emissions from a suburban yard waste composting facility. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 8(2) :177–185.
- Huang, C.-Y., Lee, C.-C., Li, F.-C., Ma, Y.-P., and Su, H.-J. J. (2002). The seasonal distribution of bioaerosols in municipal landfill sites : a 3-yr study. Atmospheric Environment, 36 :4385–4395.
- Huffman, J. A., Treutlein, B., and Poschl, U. (2010). Fluorescent biological aerosol particle concentrations and size distributions measured with an ultraviolet aerodynamic particle sizer (uv-aps) in central europe. Atmos. Chem. Phys., 10(7) :3215–3233.
- Imshenetsky, A. A., Kazakov, L., and A, G. (1978). Upper boundary of the biosphere. Ap, 35 :1–5.
- INRS (2010). Endotoxines. Technical report, INRS.
- Ishii, K., Fukui, M., and Takii, S. (2000). Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. J Appl Microbiol, 89(5) :768–777.

- Ishii, K. and Takii, S. (2003). Comparison of microbial communities in four different composting processes as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. Journal of Applied Microbiology, 95(1) :109–119.
- Israel, I.i, a. S. B. T. and Lighthart, B. (1993). Protection of freeze-dried escherichia coli by trehalose upon exposure to environmental conditions. Cryobiology, 30 :519–523.
- Jaenicke, R. (2005). Abundance of cellular material and proteins in the atmosphere. Science, 308 :73.
- Jaroz, N. (2004). Etude de la dispersion atmosphérique du pollen de maïs, contribution À la maîtrise des risques de pollinisation croisée. PhD thesis, AgroParisTech.
- Jensen, P., Lighthart, B., Morhr, A., and Shaffer, B. (1994). Instrumentation used with microbial aerosols. Atmospheric Microbial Aerosols Theory and applications, pages 226–284.
- Jericho, K.W.F. and Ho, J. and Kozub, G. (2000). Aerobiology of a high-line speed cattle abattoir. Journal of Food Protection, 63 :1523–1528.
- Jickells, T. D., An, Z. S., Andersen, K. K., Baker, A. R., Bergametti, G., Brooks, N., Cao, J. J., Boyd, P. W., Duce, R. A., Hunter, K. A., Kawahata, H., Kubilay, N., laRoche, J., Liss, P. S., Mahowald, N., Prospero, J. M., Ridgwell, A. J., Tegen, I., and Torres, R. (2005). Global iron connections between desert dust, ocean biogeochemistry, and climate. Science, 308(5718) :67–71.
- Jones, A. M. and Harrison, R. M. (2004). The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations—a review. Science of The Total Environment, 326(1-3) :151–180.
- Kampfer, P., Jureit, C., Albrecht, A., and Neef, A. (2002). Immission of microorganisms from composting facilities. In Klammer, S., editor, Microbiology of composting.
- Karra, S. and Katsivela, E. (2007). Microorganisms in bioaerosol emissions from wastewater treatment plants during summer at a mediterranean site. Water Res, 41(6) :1355–65.
- Katial, R. K., Zhang, Y., Jones, R. H., and Dyer, P. D. (1997). Atmospheric mold spore counts in relation to meteorological parameters. International Journal of Biometeorology, 41(1) :17–22.
- Keer, J. and Birch, L. (2003). Molecular methods for the assessment of bacterial viability. Journal of Microbiological Methods, 53 :175–183.
- Kellogg, C. A. and Griffin, D. W. (2006). Aerobiology and the global transport of desert dust. Trends in Ecology & Evolution, 21(11) :638–644.

- Kempf, B. and Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. Archives of Microbiology, 170(5) :319–330.
- Kilham, P. (1981). Pelagic bacteria : Extreme abundances in african saline lakes. Naturwissenschaften, 68 :380–381.
- Klamer, M. and Baath, E. (1998). Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis. Fems Microbiology Ecology, 27(1) :9–20.
- Kogure, K., Simidu, U., and Taga, N. (1978). A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. Can J Microbiol., 25 :415–420.
- Korzeniewska, E., Filipkowska, Z., Gotkowska-Plachta, A., Janczukowicz, W., Dixon, B., and Czulowska, M. (2009). Determination of emitted airborne microorganisms from a bio-pak wastewater treatment plant. Water Research, 43(11) :2841–2851.
- Kurup, V. P. and Agre, N. S. (1983). Transfer of micropolyspora rectivirgula (krassilnikov and agre 1964) lechevalier, lechevalier, and becker 1966 to faenia gen. nov. Int J Syst Bacteriol, 33(3) :663–665.
- Lacey, J. (1989). Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 4, chapter Thermoactinomyces, pages 2573–2585. Williams and Wilkins, Baltimore, Md.
- Lacey, J. (1991). Airborne Microorganisms Associated with Domestic Waste Composting. Warren Spring Laboratory eds,.
- Lange, J. L., Thorne, P. S., and Lynch, N. (1997). Application of flow cytometry and fluorescent in situ hybridization for assessment of exposures to airborne bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 63(4) :1557–1563.
- Laybourn-Parry, J. (2002). Survival mechanisms in antarctic lakes. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B : Biological Sciences, 357(1423) :863–869.
- Lechevalier, M. P. (1989). Practical handbook of microbiology, chapter Lipids in Bacterial taxonomy, pages 455–561.
- Lee, S. H., Lee, H. J., Kim, S. J., Lee, H. M., Kang, H., and Kim, Y. P. (2010). Identification of airborne bacterial and fungal community structures in an urban area by t-rflp analysis and quantitative real-time pcr. Science of the Total Environment, 408(6) :1349–1357.
- Lee, S. J., Park, J. S., Im, H. T., and Jung, H.-I. (2008). A microfluidic atp-bioluminescence sensor for the detection of airborne microbes. Sensors and Actuators B : Chemical, 132(2) :443–448.
-

- Lee, T., Grinshpun, S. A., Martuzevicius, D. and Adhikari, A., Crawford, C. M., and Luo, J. and Reponen, T. (2006). Relationship between indoor and outdoor bioaerosols collected with a button inhalable aerosol sampler in urban homes. Indoor Air, 1 :37–47.
- Lewis, E. and E., S. (2004). Sea salt aerosol production : mechanisms, methods, measurements and models.
- Li, D.-W. and Kendrick, B. (1994). Functional relationships between airborne fungal spores and environmental factors in kitchener-waterloo, ontario, as detected by canonical correspondence analysis. Grana, 33(3) :166 – 176.
- Li, W., Head, E., and Glen Harrison, W. (2004). Macroecological limits of heterotrophic bacterial abundance in the ocean. Deep-Sea Res, 51 :1529–1540.
- Lie, Y. S. and Petropoulos, C. J. (1998). Advances in quantitative pcr technology : 5 ' nuclease assays. Current Opinion in Biotechnology, 9(1) :43–48.
- Lighthart, B. (1997). The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere. FEMS Microbiology Ecology, 23(4) :263–274.
- Lighthart, B., Shaffer, B. T., a. F. A. S., and Paterno, D. (2004). Meteorological variables associated with population density of culturable atmospheric bacteria at a summer site in the mid-willamette river valley, oregon. Technical report.
- Lighthart, B. and Shaffer, B. T. (1994). Bacterial flux from chaparral into the atmosphere in mid-summer at a high desert location. Atmos. Environ., 28 :1267–1274.
- Lin, X., Reponen, T., Willeke, K., Wang, Z., Grinshpun, S. A., and Turnov, M. (2000). Survival of airborne microorganisms during swirling aerosol collection. Aerosol Science and Technology, 32 :184–196.
- Lin, X., Willeke, K., Ulevicius, V., and Grinshpun, S. A. (1997). Effect of sampling on the collection efficiency of all-glass impingers. Am Ind Hyg Assoc J, 58 :480–488.
- Lindemann, J., Constantinidou, H., Barchet, W., and Upper, C. (1982). Plants as sources of airborne bacteria, including ice nucleation active bacteria. Appl. Environ. Microb., 44 :1059–1063.
- Lindow, S. E. and Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. Appl. Environ. Microbiol., 69 :1875–1883.
- Liu, H., Xu, Y., Ma, Y., and Zhou, P. (2000). Characterization of micrococcus antarcticus sp. nov., a psychrophilic bacterium from antarctica. Int J Syst Evol Microbiol, 50(2) :715–719.
- Luoma, M. and Batterman, Stuart, A. (2001). Characterization of particulate emissions from occupant activities in offices. Indoor Air, 11(1) :35–48.

- Maier, R., Peper, I., and Gerba, C. P. (2009). Environmental microbiology second edition. Academic press.
- Mainelis, G. (1999). Collection of airborne microorganisms by electrostatic precipitation. Aerosol Science and Technology, 30(2) :127 – 144.
- Mainelis, G., Masquelier, D., Makarewicz, A., and Dzenitis, J. (2005). Performance characteristics of the aerosol collectors of the autonomous pathogen detection system (apds). Aerosol Science and Technology, 39 :461–471.
- Maki, T., Susuki, S., Kobayashi, F., Kakikawa, M., Yamada, M., Higashi, T., Chen, B., Shi, G., Hong, C., Tobo, Y., Hasegawa, H., Ueda, K., and Iwasaka, Y. (2008). Phylogenetic diversity and vertical distribution of a halobacterial community in the atmosphere of an asian dust (kosa) source region, dunhuang city. Air Qual Atmos Health, 1 :81–89.
- Mancinelli, R. L. and Shulls, W. A. (1978). Airborne bacteria in an urban environment. Ap, 35 :1095–1101.
- Mannisto, M. K. and Haggblom, M. M. (2006). Characterization of psychrotolerant heterotrophic bacteria from finnish lapland. Systematic and Applied Microbiology, 29(3) :229–243.
- Marchand, G., Lavoie, J., and Lazure, L. (1995). Evaluation of bioaerosols in a municipal solid-waste recycling and composting plant. J Air Waste Manag Assoc, 45(10) :778–781.
- Margesin, R., Sproer, C., Schumann, P., and Schinner, F. (2003). *Pedobacter cryoconitis* sp. nov., a facultative psychrophile from alpine glacier cryoconite. Int J Syst Evol Microbiol, 53(5) :1291–1296.
- Maron, P. A., Lejon, D. P. H., Carvalho, E., Bizet, K., Lemanceau, P., Ranjard, L., and Mougel, C. (2005). Assessing genetic structure and diversity of airborne bacterial communities by dna fingerprinting and 16s rdna clone library. Atmospheric Environment, 39 :3687–3695.
- Maron, P. A., Mougel, C., H. Lejon, D. P., Carvalho, E., Bizet, K., Marck, G., Cubito, N., Lemanceau, P., and Ranjard, L. (2006). Temporal variability of airborne bacterial community structure in an urban area. Atmospheric Environment, 40(40) :8074–8080.
- Marthi, B. and Lighthart, B. (1990). Effects of betaine on enumeration of airborne bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 56(5) :1286–1289.
- Matsuo, Y., Katsuta, A., Matsuda, S., Shizuri, Y., Yokota, A., and Kasai, H. (2006). *Mechercharimyces mesophilus* gen. nov., sp. nov. and *mechercharimyces asporophorigenus* sp. nov., antitumour substance-producing marine bacteria, and description of thermoactinomycetaceae fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol, 56(12) :2837–2842.

- Matthias-Maser, S. and Jaenicke, R. (1995). The size distribution of primary biological aerosol particles with radii > 0.2 [μ]m in an urban/rural influenced region. Atmospheric Research, 39(4) :279–286.
- McCluskey, R. and Sandin, R. and Greene, J. (1996). Detection of airborne cytomegalovirus in hospital rooms of immunocompromised patients. Journal of Virological Methods, 56 :115–118.
- McDevitt, J., Lees, P., Merz, W., and Schwab, K. (2004). Development of a method to detect and quantify aspergillus fumigatus conidia by quantitative pcr for environmental air samples. Mycopathologia, 158 :325–335.
- McKinley, V., Vestal, J., and Eralp, A. (1985). Microbial activity in composting. Biocycle., 26 :39–43.
- Miller, J. (1994). Mycotoxins. In Organic Dusts. Exposure, effects and prevention, Lewis Publishers :87–92.
- Millner, P. D., Bassett, D. A., and Marsh, P. B. (1980). Dispersal of aspergillus fumigatus from sewage sludge compost piles subjected to mechanical agitation in open air. Appl. Environ. Microbiol., 39(5) :1000–1009.
- Minivielle-Moncia, F. (2003). Aspects physiques et radiatifs du cycle atmosphérique des aérosols : étude numérique sur l’Océan Indien. PhD thesis, Université Blaise Pascal.
- Modini, R. L., Harris, B., and Ristovski, Z. D. (2010). The organic fraction of bubble-generated, accumulation mode sea spray aerosol (ssa). Atmos. Chem. Phys., 10 :2867–2877.
- Mohr, A. (1997). Development of models to explain the survival viruses and bacteria in aerosol. In for Microbiology, A. S., editor, Modeling the environmental fate of microorganisms.
- Mokhtari, M. (2010). Modélisation des émissions et du transport des poussières désertiques dans aladin. Technical report, CNRM Météo France.
- Moletta, M. (2005). Caractérisation de la diversité microbienne aéroportée des biogaz. PhD thesis, Université Montpellier 2.
- Moletta, M., Delgenes, J. P., and Godon, J. J. (2007). Differences in the aerosolization behavior of microorganisms as revealed through their transport by biogas. Sci Total Environ, 379(1) :75–88.
- Moriarty, D. (1977). Improved method using muramic acid to estimate biomass of bacteria in sediments. Oecologia, 26 :317–323.
- Morita, R. Y. (1975). Psychrophilic bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 39(2) :144–167.

- Morris, C. E. and Kinkel, L. L. (2002). Fifty years of phyllosphere microbiology : significant contributions to research in related fields. In Press, A., editor, Phyllosphere microbiology.
- Moularat, S. and Robine, E. (2006). Mesure des mycotoxines aéroportées. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique, 46 :180–183.
- Mouli, P., MOHAN, S. S., and Reddy, S. (2005). assement of microbial bacterial concentrations of ambient air at semi arid urban region influence of meteorological factors. Appl Environ Microbiol, 3 :139–149.
- Mullis, K. (1987). Process for amplifying nucleic acid sequences. US patent, 4 :202.
- Mustin, M. (1987). Le compost : Gestion de la matière organique.
- Muyzer, G. (1999). Dgge/tgge a method for identifying genes from natural ecosystems. Curr Opinion Microbiol, 2 :3217–3322.
- Neef, A., Schafer, R., Beimfohr, C., and Kampfer, P. (2003). Fluorescence based rrna sensor systems for detection of whole cells of saccharomonospora spp. and thermoactinomyces spp. Biosensors and Bioelectronics, 18(5-6) :565–569.
- Negrin, M., Del Panno, M., and Ronco, A. (2007). Study of bioaerosols and site influence in the la plata area (argentina) using conventional and dna (fingerprint) based methods. Aerobiologia, 23(4) :249–258.
- Nehme, B., Letourneau, V., Forster, R. J., Veillette, M., and Duchaine, C. (2008). Culture-independent approach of the bacterial bioaerosol diversity in the standard swine confinement buildings, and assessment of the seasonal effect. Environmental Microbiology, 10(3) :665–675.
- Nevalainen, A., Pastuszka, J., Liebhaber, F., and Will (1992). Performance of bioaerosol samplers : collecction characteristics and sampler design considerations. Atmos Environ, 26 :531–540.
- Nikaeen, M., Hatamzadeh, M., Hasanzadeh, A., Sahami, E., and Joodan, I. (2009). Bioaerosol emissions arising during application of municipal solid-waste compost. Aerobiologia, 25(1) :1–6.
- Nocker, A., Cheung, C.-Y., and Camper, A. K. (2006). Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of dna from dead cells. Journal of Microbiological Methods, 67 :310–320.
- Ogier, J., Son, O. and Gruss, A., Tailliez, P., and Delacroix-Buchet, A. (2002). Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol, 68 :3691–3701.

- OGorman, C. M. and Fuller, H. T. (2008). Prevalence of culturable airborne spores of selected allergenic and pathogenic fungi in outdoor air. Atmospheric Environment, 42 :4355–4368.
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. The Journal of Microbiology, 43(1) :93–100.
- Oppliger, A. and Hilfiker, S. V. D. T. (2005). Influence of seasons and sampling strategy on assessment of bioaerosols in sewage treatment plants in switzerland. Annals of Occupational Hygiene.
- Ozcan, N., Ejsing, C. S., Shevchenko, A., Lipski, A., Morbach, S., and Kramer, R. (2007). Osmolality, temperature, and membrane lipid composition modulate the activity of betaine transporter betp in corynebacterium glutamicum. J. Bacteriol., 189(20) :7485–7496.
- Pady, S. and Kelly, C. (1954). Aerobiological studies of fungi and bacteria over the atlantic ocean. Can. J. Botany, 32 :202–212.
- Palmgren, U., Strom, G. and Blomquist, G., and Malmberg, P. (1986). Collection of airborne micro-organisms on nuclepore filters, estimation and analysis—camnea method. The Journal of Applied Bacteriology, 61 :401–406.
- Partanen, P., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen, P., and Romantschuk, M. (2010). Bacterial diversity at different stages of the composting process. BMC Microbiology, 10.
- Peccia, J. and Hernandez, M. (2006). Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science : A review. Atmos Environ, 40(21) :3941.
- Peplies, J., Glockner, F., and Amann, R. (2003). Optimization strategies for dna microarray-based detection of bacteria with 16s rna-targeting oligonucleotide probes. Appl Environ Microbiol, 69 :1397–1407.
- Pepper, I. and Dowd, S. E. (2009). Aeromicrobiology. In Press, A., editor, Environmental microbiology second edition.
- Perdrix, A., Madon, N., and Maitre, A. (1997). Risques biologiques autres qu’infectieux. Toxicologie-Pathologie Professionnelle.
- Peters, S., Koschinsky, S., Schwieger, F., and Tebbe, C. C. (2000). Succession of microbial communities during hot composting as detected by pcr-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rna genes. Applied and Environmental Microbiology, 66(3) :930–936.

- Pilon, R. (2006). Détermination de marqueurs biologique pour identifier des microbes de type r et k du priming effect dans les sols de prairie approche isotopique à l'aide de cellulose marquée en ^{13}C . Master's thesis, Université Blaise Pascal.
- Pitkaranta, M. and Meklin, T. H. A. P. L. and Auvinen, P., a. N. A. R. H. (2008). Analysis of fungal flora in indoor dust by ribosomal dna sequence analysis, quantitative pcr, and culture. Appl Environ Microbiol, 74 :233–244.
- Polymenakou, P. N., Mandalakis, M., Stephanou, E. G., and Tselepidis, A. (2008). Particle size distribution of airborne microorganisms and pathogens during an intense african dust event in the eastern mediterranean. Environ Health Perspect, 116(3) :292–6.
- Porta, D., Milani, S., Lazzarino, A., Perucci, C., and Forastiere, F. (2009). Systematic review of epidemiological studies on health effects associated with management of solid waste. Environmental Health, 8 :60.
- Poulsen, O. M., Breum, N. O., Ebbelohj, N., Hansen, A. M., Ivens, U. I., Van Lelieveld, D., Malmros, P., Matthiasen, L., Nielsen, B. H., Nielsen, E. M., Schibye, B., Skov, T., Stenbaek, E. I., and Wilkins, K. C. (1995). Sorting and recycling of domestic waste. review of occupational health problems and their possible causes. Sci Total Environ, 198 :33–56.
- Prescott, L., Harley, J., and Klein, D. (1993). Microbiology.
- Prospero, J. (1999). Long-term measurements of the transport of african mineral dust to the southeastern united states implications for regional air quality. J. Geophys. Res., 104 :15917–15927.
- Radosevich, J. L., Wilson, W. J., Shinn, J. H., DeSantis, T. Z., and Andersen, G. L. (2002). Development of a high-volume aerosol collection system for the identification of air-borne micro-organisms. Lett Appl Microbiol, 34(3) :162–7.
- Raes, F., Dingenen, R. V., Vignati, E., Wilson, J., Putaud, J.-P., Seinfeld, J. H., and Adams, P. (2000). Formation and cycling of aerosols in the global troposphere. Atmospheric Environment, 34(25) :4215–4240.
- Ranalli, G., Grazia, L., and Roggeri, A. (1999). The influence of hay-packing techniques on the presence of *saccharopolyspora rectivirgula*. Journal of Applied Microbiology, 87(3) :359–365.
- Recer, G., Browne, M., Horn, E., Hill, K., and Boehler, W. (2001). Ambient air levels of *aspergillus fumigatus* and thermophilic actinomycetes in a residential neighborhood near a yard-waste composting facility. Aerobiologia, 17(2) :99–108.
- RECORD (2008). Particules émises par les activités de traitement des déchets, de la caractérisation à l'impact sanitaire. etat des connaissances. Technical report.

- Reiman, M. and Uitti, J. (2000). Exposure to microbes, endotoxins and total dust in cigarette and cigar manufacturing : an evaluation of health hazards. The Annals of Occupational Hygiene, 44 :467–473.
- Renoux, A. and Boulaud, D. (1998). Les aérosols : Physique et métrologie. Lavoisier.
- Riachi, K. (1998). Compostage d’ordures ménagères et de déchets verts flore fongique et risques sanitaires potentiels. PhD thesis, Université Joseph Fourier.
- Robine, E., Lacaze, I., Moularat, S., Boissier, M., and Ritoux, S. (2006). Mesure des aérosols fongiques dans l’air : utilisation de l’ergostérol. Revue Française d’Allergologie et d’Immunologie Clinique, 46 :174–179.
- Roszack, D. and Colwell, R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiol. Rev., 51 :365–379.
- Rudi, K., Moen, B., Dromtorp, S. M., and Holck, A. L. (2005). Use of ethidium monoazide and pcr in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. Appl. Environ. Microbiol., 71 :1018–1024.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Coosemans, J., Deprins, K., and Swings, J. (2003a). Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. Journal of Applied Microbiology, 94(1) :127–137.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Vaes, K., Klammer, S., De Clercq, D., Coosemans, J., Insam, H., and Swings, J. (2003b). A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. Ann Microbiol, 53(4) :349–410.
- Rylander, R. and Jacobs, R. (1994). Organic dust, exposure effects and prevention. Lewis publishers.
- Sahu, A., Grimberg, S. J., and Holsen, T. M. (2005). A static water surface sampler to measure bioaerosol deposition and characterize microbial community diversity. Journal of Aerosol Science, 36(5-6) :639–650.
- Sanchez-Monedero, M. and Stentiford, E. I. (2003). Generation and dispersion of airborne microorganisms from composting facilities. Trans IChemE, 81 :166–170.
- Sanchez-Monedero, M. A., Aguilar, M. I., Fenoll, R., and Roig, A. (2008). Effect of the aeration system on the levels of airborne microorganisms generated at wastewater treatment plants. Water Research, 42(14) :3739–3744.
- Sanchez-Monedero, M. A., Stentiford, E. I., and Urpilainen, S. T. (2005). Bioaerosol generation at large-scale green waste composting plants. J Air Waste Manag Assoc, 55(5) :612–8.

- Sattler, B., Puxbaum, H., and Psenner, R. (2001). Bacterial growth in supercooled cloud droplets. Geophys. Res. Lett., 28(2) :239–242,.
- Sawyer, M.H.and Chamberlin, C. W. Y. A. N. and Wallace, M. (1994). Detection of varicella-zoster virus-dna in air samples from hospital rooms. Journal of Infectious Diseases, 169 :91–94.
- Scheff, P., Paulius, V., Curtis, L., and Conroy, L. (2000). Indoor air quality in a middle school, part ii : Development of emission factors for particulate matter and bioaerosols. Appl Occup Environ Hyg, 15 :835–42.
- Schloss, P. D., Hay, A. G., Wilson, D. B., and Walker, L. P. (2003). Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting. FEMS Microbiology Ecology, 46(1) :1–9.
- Schlosser, O. (2007). Les bioaérosols du compostage : quels risques sanitaires. Journée Technique ASTEE/AFSSA.
- Schlosser, O. and Loret, J. (2005). le risque des bioaérosols dans l’environnement des stations d’épuration. Suez Environnement / CIRSEE.
- Schwieger, F. and Tebbe, C. C. (1998). A new approach to utilize pcr-single-strandconformation-polymorphism for 16s rna gene-based microbial community analysis. Applied and Environmental Microbiology, 64 :4870–4876.
- Seshadri, S., Han, T., Krumins, V., Fennell, D. E., and Mainelis, G. (2009). Application of atp bioluminescence method to characterize performance of bioaerosol sampling devices. Journal of Aerosol Science, 40(2) :113–121.
- Shaffer, B. T. and Lighthart, B. (1997). Survey of culturable airborne bacteria at four diverse locations in oregon : Urban, rural, forest, and coastal. Microbial Ecology, 34(3) :167–177.
- Sharma, V. K., Canditelli, M., Fortuna, F., and Cornacchia, G. (1997). Processing of urban and agro-industrial residues by aerobic composting : Review. Energy Conversion and Management, 38(5) :453–478.
- Shelton, B., Kirkland, K., Flanders, W. D., and Morris, G. K. (2002). Profiles of airborne fungi in buildings and outdoor environments in the united states. Applied and Environmental Microbiology, 68(4) :1743–1753.
- Sheridan, P. P. and Brenchley, J. E. (2000). Characterization of a salt-tolerant family 42 beta -galactosidase from a psychrophilic antarctic planococcus isolate. Appl. Environ. Microbiol., 66(6) :2438–2444.

- Silva, C. F., Azevedo, R. S., Braga, C., Silva, R. d., Dias, E. S., and Schwan, R. F. (2009). Microbial diversity in a bagasse-based compost prepared for the production of *agaricus brasiliensis*. Brazilian Journal of Microbiology, 40 :590–600.
- Simon, I., Deoux, S., and Ott, M. (2007). L'éviction des allergènes et des polluants chimiques de l'habitat, quelles propositions pratiques, quels matériels utiliser? Revue des Maladies Respiratoires, 24(2) :241–242.
- Singh, S., Madlala, A. M., and Prior, B. A. (2003). *Thermomyces lanuginosus* : properties of strains and their hemicellulases. Fems Microbiology Reviews, 27(1) :3–16.
- Steger, K., Sjogren, A. M., Jarvis, A., Jansson, J. K., and Sundh, I. (2007). Development of compost maturity and actinobacteria populations during full-scale composting of organic household waste. J Appl Microbiol, 103(2) :487–498.
- Stepalska, D. and Wolek, J. (2009). Intradiurnal periodicity of fungal spore concentrations (*alternaria*, *botrytis*, *cladosporium*, *didymella*, *ganoderma*) in cracow, poland. Aerobiologia, 25(4) :333–340.
- Stetzenbach, L. D. (1992). Airborne microorganisms. In Lederberg, J., editor, Encyclopedia of Microbiology, volume 1, pages 53–65. New York, academic press inc edition.
- Strom, P. F. (1985). Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting. Appl Environ Microbiol, 50(4) :906–13.
- Swan, J. R. M., Kelsey, A., Crook, B., and Gilbert, E. J. (2003). Occupational and environmental exposure to bioaerosols from composts and potential health effects - A critical review of published data. Health & safety executive edition.
- Swap, R., M., Garstang, S., Greco, R., Talbot, and Kallberg, P. (1992). Saharan dust in the amazon basin. Tellus, 44 :133–149.
- Syzdek, L. (1985). Influence of *serratia marcescens* pigmentation on cell concentrations in aerosols produced by bursting bubbles. Appl Environ Microbiol., 49 :173–178.
- Szekely, A., Sipos, R., Berta, B., Vajna, B., Hajda, C., and Marialigeti, K. (2008). Dgge and t-rflp analysis of bacterial succession during mushroom compost production and sequence-aided t-rflp profile of mature compost. Microbial Ecology.
- Taha, M. P. M., Drew, G. H., Longhurst, P. J., Smith, R., and Pollard, S. J. T. (2006). Bioaerosol releases from compost facilities : Evaluating passive and active source terms at a green waste facility for improved risk assessments. Atmos Environ, 40(6) :1159–1169.

- Taha, M. P. M., Drew, G. H., Tamer Vestlund, A., Aldred, D., Longhurst, P. J., and Pollard, S. J. T. (2007). Enumerating actinomycetes in compost bioaerosols at source—use of soil compost agar to address plate ‘masking’. Atmospheric Environment, 41 :4759–4765.
- Taha, M. P. M., Pollard, S. J. T., Sarkar, U., and Longhurst, P. (2005). Estimating fugitive bioaerosol releases from static compost windrows : Feasibility of a portable wind tunnel approach. Waste Manag, 25(4) :445–450.
- Takaku, H., Kodaira, S., Kimoto, A., Nashimoto, M., and Takagi, M. (2006). Microbial communities in the garbage composting with rice hull as an amendment revealed by culture-dependent and -independent approaches. J Biosci Bioeng, 101(1) :42–50.
- Tanner, B. D., Brooks, J. P., Gerba, C. P., Haas, C. N., Josephson, K. L., and Pepper, I. L. (2008). Estimated occupational risk from bioaerosols generated during land application of class b biosolids. Journal of Environmental Quality, 37(6) :2311–2321.
- Tanner, B. D., Brooks, J. P., Haas, C. N., Gerba, C. P., and Pepper, I. L. (2005). Bioaerosol emission rate and plume characteristics during land application of liquid class b biosolids. Environmental Science & Technology, 39(6) :1584–1590.
- Taroncher-Oldenburg, G., Griner, E., Francis, C., and Ward, B. (2003). Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. Appl Environ Microbiol, 69 :1159–1171.
- Theron, J. and Cloete, T. E. (2000). Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. Critical Reviews in Microbiology, 26 :37–57.
- Thummes, K. and, K. P. and Jackel, U. (2007a). Temporal change of composition and potential activity of the thermophilic archaeal community during the composting of organic material. Systematic and Applied Microbiology, 30 :418–429.
- Thummes, K. and, K. P. and Jackel, U. (2007b). Thermophilic methanogenic archaea in compost material : Occurrence, persistence and possible mechanisms for their distribution to other environments. Systematic and Applied Microbiology, 30 :634–643.
- Tilley, R., E. D. and Ho, J. (2001). Background bioaerosols and aerosols at two sites in northern australia : Preliminary measurements. Technical report, DSTO Aeronautical and Maritime Research Laboratory.
- Timmons, D., Fulton, J., and Mitchell, R. (1966). Microorganisms of the upper atmosphere. Appl Environ Microbiol, 14 :229–231.

- Tiquia (2002). Microbiology of composting, chapter Bacterial diversity in Livestock Manure compost as characterized by T-RFLP of PCR amplified 116S rDNA gene Sequences, pages 66–82.
- Tolvanen, O., Nykanen, J., Nivukoski, U., Himanen, M., Veijanen, A., and Hanninen, K. (2005). Occupational hygiene in a finnish drum composting plant. Waste Management, 25 :427–433.
- Tong, Y. and Lighthart, B. (1997). Solar radiation is shown to select for pigmented bacteria in the ambient outdoor atmosphere. Photochemistry and Photobiology, 65(1) :103–106.
- Tringe, S. G., Zhang, T., Liu, X., Yu, Y., Lee, W. H., Yap, J., Yao, F., Suan, S. T., Ing, S. K., Haynes, M., Rohwer, F., Wei, C. L., Tan, P., Bristow, J., Rubin, E. M., and Ruan, Y. (2008). The airborne metagenome in an indoor urban environment. PLOS ONE, 3(4) :1862.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., and Itavaara, M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment : a review. Bioresour Technol, 72 :169–183.
- Vadrot, C. and Bex, V., Mouilleseaux, A. and Squinazi, F., and Darbord, J.-C. (2004). Detection of mycobacterium tuberculosis complex by pcr in hospital air samples. Journal of Hospital Infection, 58 :262–267.
- Vaitilingom, M., Amato, P., Sancelme, M., Laj, P., Leriche, M., and Delort, A.-M. (2010). Contribution of microbial activity to carbon chemistry in clouds. Appl. Environ. Microbiol., 76(1) :23–29.
- Van de Peer, Y., Chapelle, S., and De Wachter, R. (1996). A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rna. Nucl. Acids Res., 24(17) :3381–3391.
- Vaz-Moreira, I., Nobre, M. F., Nunes, O. C., and Manaia, C. M. (2007). Pseudosphingobacterium domesticum gen. nov., sp nov., isolated from home-made compost. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57 :1535–1538.
- Venkateswaran, A., McFarlan, S. C., Ghosal, D., Minton, K. W., Vasilenko, A., Makarova, K., Wackett, L. P., and Daly, M. J. (2000). Physiologic determinants of radiation resistance in deinococcus radiodurans. Appl. Environ. Microbiol., 66(6) :2620–2626.
- Verreault, D., Moineau, S., and Duchaine, C. (2008). Methods for sampling of airborne viruses. Appl Environ Microbiol, 72 :413–444.
- Vinneras, B., Schonning, C., and Nordin, A. (2006). Identification of the microbiological community in biogas systems and evaluation of microbial risks from gas usage. Science of The Total Environment, 367(2-3) :606–615.

- Wainwright, M., Wickramasinghe, N. C., Narlikar, J. V., and Rajaratnam, P. (2003). Microorganisms cultured from stratospheric air samples obtained at 41 km. FEMS Microbiol Ecol, 218(1) :161–165.
- Waksman, S. A. and Corke, C. T. (1953). *Thermoactinomyces tsiklinsky*, a genus of thermophilic actinomycetes. Journal of Bacteriology, 66(4) :377–378.
- Walter, M. V., Marthi, B., Fieland, V. P., and Ganio, L. M. (1990). Effect of aerosolization on subsequent bacterial survival. Appl. Environ. Microbiol., 56(11) :3468–3472.
- Wheeler, P., Stewart, I., Dumitrean, P., and Donovan, B. (2001). Health effects of composting : a study of three compost sites and review of past data. Technical report, Environmental Agency.
- White, L., hadley, D., Davids, D., and Naylor, R. (1975). Improved large volume sampler for the collection of bacterial cells from aerosol. Appl. Microbiol, 29 :335–339.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., and Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes : The unseen majority. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(12) :6578–6583.
- Willeke, K., Lin, X., and Grinshpun, S. A. (1998). Improved aerosol collection by combined impaction and centrifugal motion. Aerosol Science and Technology, 28 :438–456.
- Williams, R., Ward, E., and McCartney, H. (2001). Methods for integrated air sampling and dna analysis for detection of airborne fungal spores. Applied and environmental microbiology, 67 :2453–2459.
- Wilson, K., Wilson, W., Radosevich, J., DeSantis, T., Viswanathan, V., Kuczmariski, T., and Andersen, G. (2002). High-density microarray of small-subunit ribosomal dna probes. Appl. Environ. Microbiol., 68 :2535–2541.
- Wu, L., Thompson, D., Li, G., Hurt, R., Tiedje, J., and Zhou, J. (2001). Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. Appl Environ Microbiol, 67 :5780–5790.
- Wu, P. C., Su, H. J., and Lin, C. Y. (2000). Characteristics of indoor and urban homes in two seasons. The science of the total environment, 253 :111–118.
- Wu, S., Ueno, D., Koichi Inoue, K., and Someya, T. (2009). Direct viable count combined with fluorescence in situ hybridization (dvc-fish) for specific enumeration of viable *escherichia coli* in cow manure. Microbes and Environments, 24(1) :33–38.
- Yamada, T., Suzuki, A., Ueda, H., Ueda, Y., Miyauchi, K., and Endo, G. (2008). Successions of bacterial community in composting cow dung wastes with or without hyperthermophilic pre-treatment. Applied Microbiology and Biotechnology, 81(4) :771–781.

- Yamahira, K., Hirota, K., Nakajima, K., Morita, N., Nodasaka, Y., and Yumoto, I. (2008). *Acinetobacter* sp. strain ths, a novel psychrotolerant and alkalitolerant bacterium that utilizes hydrocarbon. Extremophiles, 12(5) :729–734.
- Yang, Y., Yokobori, S.-i., and Yamagishi, A. (2010). Panspermia : Testing for the inter-planetary transfer of life. Journal of Cosmology, 7.
- Zuckerland, E. and Pauling, L. (1965). Evolutionary of divergence and convergence in proteins. Evolving genes and Proteins, pages 97–166.
- Zumstein, E., Moletta, R., and et al. (2000). Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (pcr) single-strand conformation polymorphism analysis. Environmental Microbiology, 2 :69–78.

Cinquième partie

Annexe

Annexe **A**

Matériel supplémentaire provenant de
l'article 1

Ce tableau regroupe l'ensemble des phylotypes bactériens obtenus tandis que le tableau présenté dans l'article répertorie uniquement les phylotypes ayant une abondance supérieure à 1%.

TABLEAU A.1: Phylogenetic positioning and sequences number for each bacterial phylotype. The table was ranked by decreasing number of sequences by phylotypes

Phylotypes	Number of sequences					Phylum	Closest relatives ² (accession number)	Similarity (%)
	A	B	C	D	E			
NC16	0	6	34	12	5	57	<i>Actinobacteria</i> <i>Thermobifida fusca</i> strain S22-1 (AM932257)	99
NA07	21	18	1	5	2	47	<i>Actinobacteria</i> bacterium isolate BF0002D063 (AM697552) <i>Saccharopolyspora rectivirgula</i> (X53194)	99 97
NA55	3	28	1	1	0	33	<i>Actinobacteria</i> <i>Saccharomonospora glauca</i> (AF139880)	99
NC11	0	4	6	12	10	32	<i>Firmicutes</i> <i>Planifilum gunnanensis</i> (DQ119659)	99
NA49	3	0	2	25	0	30	<i>Firmicutes</i> <i>Bacillus</i> sp. TAT105 (AB066342)	100
NC07	0	11	10	4	0	25	<i>Actinobacteria</i> <i>Saccharomonospora viridis</i> (Z38021)	99
NA02	9	0	0	0	13	22	<i>Firmicutes</i> <i>Bacillus</i> sp. BGSC W9A68 (AY608954) <i>Geobacillus caldorylosilyticus</i> (AY608951)	99 99
NA70	5	0	3	4	9	21	<i>Firmicutes</i> <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> (CP000557)	100
NA06	13	3	3	1	0	20	<i>Firmicutes</i> <i>Thermoactinomyces intermedius</i> (AF138734)	100
NC38	0	1	3	8	1	13	<i>Firmicutes</i>	
NB23	0	0	3	6	2	11	<i>Firmicutes</i> compost bacterium clone 2B11 (DQ346495)	97
NE12	0	0	0	0	10	10	γ - <i>Proteobacteria</i> <i>Acinetobacter</i> sp. Epbas6 (EU252078)	99
NB39	0	0	1	0	9	10	γ - <i>Proteobacteria</i> bacterium clone AKIW445 (DQ129592) <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (DQ518606)	100 99
Ni32	0	0	0	3	6	9	<i>Firmicutes</i> <i>Bacillus</i> sp. '5.5LF 48TD' (EF112395) <i>Bacillus subtilis</i> (AB211021)	99 98
NB04	0	0	6	0	3	9	<i>Firmicutes</i>	
NB148	0	0	1	7	0	8	<i>Firmicutes</i> bacterium clone biogas-DM2-b61 (DQ419583) <i>Planifilum fimeticola</i> (AB088364)	99 95
NB65	0	0	3	0	5	8	<i>Firmicutes</i> <i>Bacillus</i> sp.5M04 (AM690037)	100
NA27	6	0	0	1	0	7	<i>Firmicutes</i>	

Phylotypes	Number of sequences					Phylum	Closest relatives ² (accession number)	Similarity (%)
	A	B	C	D	E			
NC09	0	3	4	0	0	7	<i>Actinobacteria</i> <i>Kutzneria</i> sp. 744 (DQ181633)	95
Ni94	0	0	0	6	0	6	<i>Firmicutes</i> compost bacterium 4-11 (AB034705) <i>Bacillus</i> sp. TAT105 (AB066342)	99 98
NB89	0	0	1	5	0	6	<i>Firmicutes</i> <i>Ureibacillus</i> sp. MM196S (AB176540)	99
NA113	1	0	0	1	4	6	<i>Actinobacteria</i> Actinobacterium clone MT046 (AM157572) <i>Microbacterium</i> sp. (AF385527)	99 99
NC10	0	5	0	0	0	5	<i>Actinobacteria</i> <i>Thermomonospora mesoviformis</i> (AF028247)	99
NC111	0	4	1	0	0	5	<i>Actinobacteria</i> <i>Thermobifida fusca</i> strain S22-1 (AM932257)	99
NC26	0	4	0	1	0	5	<i>Firmicutes</i>	
NA66	4	0	0	0	0	4	<i>Firmicutes</i> <i>Bacillus</i> sp. SMCC G976 (EU446202)	100
NE34	0	0	0	0	4	4	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone ORSATCe12 (EF393132) <i>Flavobacteriaceae bacterium</i> JJC (EU523664)	98 96
NA75	3	0	1	0	0	4	<i>Firmicutes</i> <i>Bacillus smithii</i> (AB271749)	99
NC139	0	1	0	3	0	4	<i>Firmicutes</i>	
NA69	1	0	1	0	2	4	<i>Firmicutes</i> <i>Bacillus</i> sp. TP-84 (AJ002154)	98
NA42	3	0	0	0	0	3	<i>Firmicutes</i>	
NC137	0	3	0	0	0	3	<i>Actinobacteria</i> <i>Saccharomonospora caesia</i> (Z38024)	97
NB25	0	0	3	0	0	3	<i>Firmicutes</i>	
Ni37	0	0	0	3	0	3	<i>Firmicutes</i> compost bacterium 4-21 (AB034709)	98
NE94	0	0	0	0	3	3	<i>Firmicutes</i> <i>Ureibacillus koreensis</i> strain HC 148 (DQ348072)	98
NE01	0	0	0	0	3	3	<i>Actinobacteria</i> bacterium isolate BF0002A025 (AM696840) <i>Corynebacterium variabile</i> isolate (AJ783438)	98 98
NE38	0	0	0	0	3	3	γ - <i>Proteobacteria</i> <i>Enhydrobacter</i> sp. clone 4-B (EU305591) <i>Enhydrobacter aerosaccus</i> (AJ550856)	99 98
NA43	2	0	1	0	0	3	<i>Actinobacteria</i> <i>Streptomyces thermoviolaceus</i> (Z68095)	99
NA103	2	0	0	0	1	3	<i>Actinobacteria</i> <i>Streptomyces</i> sp.HNL06 (EU373339)	99
NA03	1	0	2	0	0	3	α - <i>Proteobacteria</i> proteobacterium (DQ828902)	98

Phylotypes	Number of sequences					Phylum	Closest relatives ² (accession number)	Similarity (%)
	A	B	C	D	E			
NA25	1	0	0	0	2	3	<i>Actinobacteria</i> <i>Mesorhizobium</i> sp. Q-2 (AB246806)	99
NB52	0	0	2	0	1	3	<i>Firmicutes</i> <i>Streptomyces cellulosae</i> (DQ442495) bacterium clone 2G4-119 (EU160333) <i>Bacillus</i> sp.S13 (AF403022)	100 100 99
Ni168	0	0	0	2	1	3	<i>Firmicutes</i> <i>Bacillus coagulans</i> (AF466695)	100
Ni126	0	0	0	1	2	3	<i>Firmicutes</i> <i>Paenibacillus</i> sp.B518 (AY839866) <i>Paenibacillus ginsengisoli</i> (AB245382)	90 90
Ni205	0	0	0	1	2	3	<i>Firmicutes</i>	
NA20	2	0	0	0	0	2	<i>Actinobacteria</i> <i>Saccharopolyspora hirsuta</i> (DQ381814)	99
NA83	2	0	0	0	0	2	<i>Bacteroidetes</i> <i>Taxobacter</i> sp. EB54 (AM265541)	96
NC60	0	2	0	0	0	2	<i>Actinobacteria</i> <i>Nocardopsis composita</i> (AB368717)	100
NC72	0	2	0	0	0	2	<i>Actinobacteria</i> <i>Streptomyces thermoatroviridis</i> (AB184586)	100
NC84	0	2	0	0	0	2	<i>Firmicutes</i> <i>Clostridium peptidovorans</i> (AF156796)	99
NC86	0	2	0	0	0	2	<i>Actinobacteria</i> <i>Corynebacterium</i> sp.BBDP55 (DQ337519) <i>Corynebacterium efficiens</i> (AB055965)	99 98
NC121	0	2	0	0	0	2	<i>Actinobacteria</i> <i>Thermocrispum agreste</i> (X79183)	99
NC03	0	2	0	0	0	2	<i>Actinobacteria</i>	
NB82	0	0	2	0	0	2	<i>Firmicutes</i> bacterium clone RL184 aan81c03 (DQ809588)	99
NB118	0	0	2	0	0	2	<i>Firmicutes</i>	
NB102	0	0	2	0	0	2	<i>Actinobacteria</i> <i>Actinomadura hallensis</i> (DQ076484)	98
NB78	0	0	2	0	0	2	<i>Firmicutes</i> compost bacterium clone 5B01 (DQ346606) <i>Ammoniphilus oxalaticus</i> (Y14579)	97 96
NB74	0	0	2	0	0	2	α - <i>Proteobacteria</i> <i>Devosia</i> sp.R-21940 (AJ786801)	99
Ni189	0	0	0	2	0	2	<i>Actinobacteria</i>	
Ni28	0	0	0	2	0	2	<i>Firmicutes</i> bacterium clone : CFB-4 (AB274493)	100
Ni255	0	0	0	2	0	2	<i>Firmicutes</i> <i>Symbiobacterium</i> sp.KY38 (AB361629) <i>Symbiobacterium thermophilum</i> (AF006840)	100 98

Phylotypes	Number of sequences					Phylum	Closest relatives ² (accession number)	Similarity (%)
	A	B	C	D	E			
NE56	0	0	0	0	2	2	<i>α-Proteobacteria</i> bacterium clone PR12 (DQ298332) alpha proteobacterium clone AKYG623 (AY922042)	98 98
NE126	0	0	0	0	2	2	<i>Actinobacteria</i> <i>Thermocrispum municipale</i> (X79184)	99
NE33	0	0	0	0	2	2	<i>Actinobacteria</i> <i>Corynebacterium</i> sp.clone TCCC (EU567065) <i>Corynebacterium glutamicum</i> (BA000036)	99 99
NE131	0	0	0	0	2	2	<i>Firmicutes</i> <i>Bacillus</i> sp. CFM6 (EU417661)	99
NE46	0	0	0	0	2	2	<i>Firmicutes</i>	
NE62	0	0	0	0	2	2	<i>Firmicutes</i>	
NA23	1	0	1	0	0	2	<i>α-Proteobacteria</i> <i>Ochrobactrum</i> sp.15 (EF537010)	99
NA05	1	0	0	1	0	2	<i>Actinobacteria</i> bacterium clone biogas-DM1-b38 (DQ419677) <i>Thermomonospora</i> sp.S22-23 (AM932264)	99 99
NC114	0	1	1	0	0	2	<i>Firmicutes</i> bacterium clone SMC39 (AM183096) <i>Desemzia incerta</i> (Y17300)	100 100
NC126	0	1	1	0	0	2	<i>Actinobacteria</i> actinobacterium DOKCONFYM (DQ828600) <i>Microbispora</i> sp.STS-107 (AY701903)	95 95
NC94	0	1	0	0	1	2	<i>Firmicutes</i>	
NB146	0	0	1	1	0	2	<i>Actinobacteria</i> <i>Corynebacterium freneyi</i> (EF462414)	100
NB97	0	0	1	1	0	2	<i>α-Proteobacteria</i> bacterium clone P3B B3 (EF551997)	96
NB140	0	0	1	0	1	2	<i>Firmicutes</i>	
NB17	0	0	1	0	1	2	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone ORSATC e12 (EF393132) <i>Chryseobacterium isbiliense</i> (AM159184)	97 97
Ni89	0	0	0	1	1	2	<i>Firmicutes</i> <i>Clostridium</i> sp.B40-2 (AB059472) <i>Clostridium thermopalmarium</i> (AF286862)	99 99
Ni216	0	0	0	1	1	2	<i>Bacteroidetes</i> bacterium clone ORSATC e12 (EF393132) <i>Haloanella gallinarum</i> (AB035150)	96 96
NA110	1	0	0	0	0	1	<i>Firmicutes</i> <i>Bacilli</i> bacterium clone H5Ba08 (AY360560) <i>Bacillus arbutinivorans</i> (AF519469)	97 96

Phylotypes	Number of sequences					Phylum	Closest relatives ² (accession number)	Similarity (%)
	A	B	C	D	E			
NA108	1	0	0	0	0	1	<i>Firmicutes</i> <i>Bacillus subtilis</i> strain S8-18 (EU624423)	100
NA109	1	0	0	0	0	1	<i>Firmicutes</i> <i>Bacillus sp.</i> SL213 (EF379274)	98
NA87	1	0	0	0	0	1	<i>Firmicutes</i> bacterium clone :EPE313 (AB332117) <i>Clostridium sp.</i> (X98395)	97 97
NA56	1	0	0	0	0	1	<i>Firmicutes</i> <i>Bacillus sp.</i> clone AV 7R-N-B03 (EU341260) <i>Geobacillus sp.</i> TSB-10 (EF017794)	99 99
NA18	1	0	0	0	0	1	<i>Firmicutes</i> <i>Planifilum fimeticola</i> strain H0165 (AB088364)	98
NA16	1	0	0	0	0	1	<i>Firmicutes</i> rumen bacterium clone BRC25 (EF436311) <i>Planococcus sp.</i> RM9P (EF675619)	99 98
NA67	1	0	0	0	0	1	<i>Firmicutes</i> bacterium clone AKIW584 (DQ129335) <i>Thermoactinomyces sp.</i> JAM-FM1001 (AB362275)	99 96
NA48	1	0	0	0	0	1	<i>Firmicutes</i> bacterium clone B55 K B C04 (DQ887963)	95
NA144	1	0	0	0	0	1	<i>Firmicutes</i>	
NA76	1	0	0	0	0	1	<i>Actinobacteria</i> <i>Amycolatopsis sp.</i> GY307 (AF466101)	99
NA24	1	0	0	0	0	1	<i>Actinobacteria</i> bacterium isolate BF0002D063 (AM697552)	97
NA19	1	0	0	0	0	1	<i>Actinobacteria</i> Brevibacterium samyangensis (DQ344485)	98
NA09	1	0	0	0	0	1	<i>Actinobacteria</i> bacterium isolate BF0002D115 (AM697604) <i>Gordonia sp.</i> HD321 (AF432348)	99 99
NA28	1	0	0	0	0	1	<i>Actinobacteria</i> <i>Streptomyces sp.</i> MTCC 8377 (EU523135)	100
NA102	1	0	0	0	0	1	<i>Actinobacteria</i> <i>Thermomonospora chromogena</i> (AF116560)	99
NA90	1	0	0	0	0	1	<i>Actinobacteria</i>	
NA80	1	0	0	0	0	1	α - <i>Proteobacteria</i> bacterium clone C7-DM-12 (DQ082889) <i>Mycoplana caenistrai</i> n K107 (EF532794)	95 95
NA10	1	0	0	0	0	1	α - <i>Proteobacteria</i> <i>Parococcus sp.</i> clone AV 4S-G11 (EU341162) <i>Parococcus sp.</i> JL1148 (DQ985067)	100 100
NA94	1	0	0	0	0	1	α - <i>Proteobacteria</i> <i>Rhodobacteriales bacterium</i> (DQ857222) <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (AB196354)	98 97

Phylotypes	Number of sequences					Phylum	Closest relatives ² (accession number)	Similarity (%)
	A	B	C	D	E			
NA86	1	0	0	0	0	1	<i>α-Proteobacteria</i> <i>Sphingomonas mucosissima</i> (AM229669)	100
NA117	1	0	0	0	0	1	<i>α-Proteobacteria</i> <i>Sphingomonas</i> sp.PF-I (DQ207361)	100
NA41	1	0	0	0	0	1	<i>β-Proteobacteria</i> <i>Bordetella hinzii</i> (AB371725)	98
NA91	1	0	0	0	0	1	<i>Bacteroidetes</i> <i>Bacteroidetes bacterium</i> (DQ828253)	95
NA31	1	0	0	0	0	1	<i>Bacteroidetes</i> <i>bacterium clone :CFB-20</i> (AB274509)	99
NA131	1	0	0	0	0	1	<i>γ-Proteobacteria</i> <i>Serratia rubidaea</i> (AB435621)	99
NA74	1	0	0	0	0	1	<i>γ-Proteobacteria</i> bacterium isolate BF0001C065 (AM697224) <i>Stenotrophomonas</i> sp.A28 (AM285010)	100 100
NC132	0	1	0	0	0	1	<i>Actinobacteria</i> <i>Brevibacterium</i> sp.Tp12 (EU484189)	100
NC145	0	1	0	0	0	1	<i>Actinobacteria</i> <i>Dietzia psychralcaliphila</i> (AB159036)	97
NC73	0	1	0	0	0	1	<i>Actinobacteria</i> <i>Micrococcus luteus</i> (AB167385)	99
NC53	0	1	0	0	0	1	<i>Actinobacteria</i> Actinobacteria clone AKYH1052 (AY922091) <i>Micrococcus xinjiangensis</i> (DQ923132)	99 97
NC22	0	1	0	0	0	1	<i>Actinobacteria</i> <i>Nocardopsis</i> sp.98-08-290A (AF328408) <i>Nocardopsis trehalosi</i> (AF105972)	95 95
NC153	0	1	0	0	0	1	<i>Actinobacteria</i> Bacterium GFCr-3 (DQ154279) <i>Propionifera</i> sp.P7 (EU109728)	95 95
NC45	0	1	0	0	0	1	<i>Actinobacteria</i>	
NC92	0	1	0	0	0	1	<i>Actinobacteria</i>	
NC176	0	1	0	0	0	1	<i>Actinobacteria</i>	
NC23	0	1	0	0	0	1	<i>Actinobacteria</i>	
NC98	0	1	0	0	0	1	<i>Firmicutes</i> Aerococcus sp. (EU341284) <i>Aerococcus viridans</i> (DQ386999)	99 99
NC13	0	1	0	0	0	1	<i>Firmicutes</i> compost bacterium clone 2B06 (DQ346478)	100
NC30	0	1	0	0	0	1	<i>Firmicutes</i> bacterium clone A55 D21HBA04 (EF559063)	100
NC62	0	1	0	0	0	1	<i>Firmicutes</i>	
NC122	0	1	0	0	0	1	<i>Bacteroidetes</i> Sphingobacterium composti (AB244764)	97

Phylootypes	Number of sequences					Phylum	Closest relatives ² (accession number)	Similarity (%)
	A	B	C	D	E			
NC54	0	1	0	0	0	1	<i>Bacteroidetes</i>	
NC173	0	1	0	0	0	1	<i>Chloroflexi</i>	
NC34	0	1	0	0	0	1	<i>Chloroflexi</i>	
NC29	0	1	0	0	0	1	α -Proteobacteria	<i>Parvibaculum</i> sp. clone 1-E (EU305567) 99 <i>Parvibaculum lavamentivorans</i> (AY387398) 98
NC19	0	1	0	0	0	1	α -Proteobacteria	<i>Wolbachia pipientis</i> (AY026912) 100
NC12	0	1	0	0	0	1	γ -Proteobacteria	<i>Lysobacter</i> sp. CC-APB9 (DQ490982) 99 <i>Lysobacter defluvi</i> (AM283465) 99
NB51	0	0	1	0	0	1	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus massiliensis</i> (DQ350822) 98
NB161	0	0	1	0	0	1	<i>Firmicutes</i>	compost bacterium clone 3B21 (DQ346535) 100 <i>Bacillus thermocloaceae</i> (Z26939) 99
NB112	0	0	1	0	0	1	<i>Firmicutes</i>	compost bacterium clone 5B26 (DQ346631) 99 <i>Bacillus</i> sp. <i>GS05</i> (DQ365581) 98
NB115	0	0	1	0	0	1	<i>Firmicutes</i>	compost bacterium clone 2B16 (DQ346500) 100
NB79	0	0	1	0	0	1	<i>Firmicutes</i>	bacterium clone GA15 (EF613733) 97
NB166	0	0	1	0	0	1	<i>Firmicutes</i>	bacterium clone 2N1-103 (EU160000) 99
NB158	0	0	1	0	0	1	<i>Firmicutes</i>	<i>Exiguobacterium</i> sp.7-3 (DQ019168) 99
NB131	0	0	1	0	0	1	<i>Firmicutes</i>	<i>Macrococcus equiperficus</i> (AJ576067) 100
NB128	0	0	1	0	0	1	<i>Firmicutes</i>	<i>Paenibacillus lactis</i> (AY257868) 98
NB90	0	0	1	0	0	1	<i>Firmicutes</i>	<i>Planococcus</i> sp.Tibet-IX21 (DQ177487) 96
NB153	0	0	1	0	0	1	<i>Firmicutes</i>	bacterium clone 2G1-27 (EU160210) 99 <i>Proteoligificum ethanoligenes strain GW</i> (EF116488) 97
NB49	0	0	1	0	0	1	<i>Firmicutes</i>	
NB138	0	0	1	0	0	1	<i>Firmicutes</i>	
NB144	0	0	1	0	0	1	<i>Firmicutes</i>	
NB77	0	0	1	0	0	1	<i>Firmicutes</i>	
NB163	0	0	1	0	0	1	<i>Firmicutes</i>	

Phylotypes	Number of sequences					Phylum	Closest relatives ² (accession number)	Similarity (%)
	A	B	C	D	E			
NB169	0	0	1	0	0	1	Actinobacteria bacterium (AY921951)	98
NB59	0	0	1	0	0	1	bacterium clone H8-814 (EF174269)	97
							<i>Actinomadura hallensis</i> (AM932278)	99
NB24	0	0	1	0	0	1	bacterium clone nbt246b12 (EU540154)	100
							<i>Arthrobacter nicotianae strain Mali 31</i> (AY211125)	100
NB47	0	0	1	0	0	1	<i>Candidatus Microthrix parvicella</i> (DQ147287)	100
NB70	0	0	1	0	0	1	<i>Gordonia sp.</i> P-60 (AM411960)	96
							<i>Gordonia terrae</i> strain CC-S5-8 (AY771337)	96
NB27	0	0	1	0	0	1	<i>Microbacterium sp.</i> pFB15 (AY336544)	99
							<i>Microbacterium esteraromaticum</i> (EU036992)	99
NB30	0	0	1	0	0	1	<i>Microbacterium sp.</i> SC-87 (AM747814)	95
NB99	0	0	1	0	0	1	<i>Rhodococcus sp.</i> cryopeg 11 (AY660692)	96
NB81	0	0	1	0	0	1	<i>Sanguibacter soli</i> isolate DCY 22 (EF547937)	99
NB162	0	0	1	0	0	1	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> (AM921646)	99
NB95	0	0	1	0	0	1	<i>Thermobifida fusca</i> strain S22-1 (AM932257)	98
NB170	0	0	1	0	0	1	<i>Actinobacteria</i>	
NB147	0	0	1	0	0	1	<i>Actinobacteria</i>	
NB151	0	0	1	0	0	1	<i>Actinobacteria</i>	
NB94	0	0	1	0	0	1	<i>Bacteroidetes bacterium</i> (EF683040)	99
NB42	0	0	1	0	0	1	<i>Hymenobacter actinosclerus</i> (Y17356)	95
NB73	0	0	1	0	0	1	<i>Pedobacter cryoconitis</i> (AM237384)	100
NB157	0	0	1	0	0	1	<i>Bacteroidetes</i>	
NB116	0	0	1	0	0	1	<i>Bacteroidetes</i>	
NB56	0	0	1	0	0	1	<i>Bacteroidetes</i>	
NB127	0	0	1	0	0	1	α -Proteobacteria <i>Methylobacteriaceae</i> (AY360616)	95
							<i>Corbulabacter subterraneus</i> (AY078053)	95
NB71	0	0	1	0	0	1	α -Proteobacteria bacterium clone P3B 205 (EF551985)	99

Phylotypes	Number of sequences					Phylum	Closest relatives ² (accession number)	Similarity (%)
	A	B	C	D	E			
NB19	0	0	1	0	0	1	<i>Nitratireductor</i> sp. (EU564843)	97
NB134	0	0	1	0	0	1	<i>Rhizobium</i> sp. Bai (DQ303478)	100
NB159	0	0	1	0	0	1	<i>Sinorhizobium</i> sp.R-25078 (AM084032)	97
NB28	0	0	1	0	0	1	bacterium clone N8 (AY376698)	98
NB63	0	0	1	0	0	1	<i>Enterobacter</i> sp. <i>Px6-4</i> (EF175731)	97
NB15	0	0	1	0	0	1	gamma proteobacterium (DQ201883)	98
NB98	0	0	1	0	0	1	eubacterium clone 131 (AJ412677)	100
NB41	0	0	1	0	0	1	<i>Caldilinea aerophila</i> (AB067647)	100
NB75	0	0	1	0	0	1	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (Y10146)	97
NB50	0	0	1	0	0	1	bacterium clone : Niitsu39-15. (AB188040)	100
Ni194	0	0	1	0	0	1	<i>Planctomycete</i> clone (EF020203)	98
Ni256	0	0	0	1	0	1	Low G+C Gram-positive (AB116132)	98
Ni242	0	0	0	1	0	1	<i>Bacillus</i> sp. <i>LMG 19636</i> (AF329473)	97
Ni60	0	0	0	1	0	1	bacterium clone : A128 (AB269505)	99
Ni29	0	0	0	1	0	1	bacterium clone biogas-DMI-b90 (DQ419670)	99
Ni265	0	0	0	1	0	1	compost bacterium clone 2B16 (DQ346500)	100
Ni152	0	0	0	1	0	1	Bacterium SSCA24 (AB210928)	98
Ni262	0	0	0	1	0	1	<i>Brevibacillus limnophilus</i> (AB112717)	97
Ni233	0	0	0	1	0	1	<i>Planifilum fimeticola</i> (AB088364)	95
Ni244	0	0	0	1	0	1	<i>Thermaerobacter</i> sp. C4-1 (AY094621)	99
Ni187	0	0	0	1	0	1	<i>Aerothermobacter marianas</i> (AB011495)	96
Ni214	0	0	0	1	0	1		
Ni263	0	0	0	1	0	1		

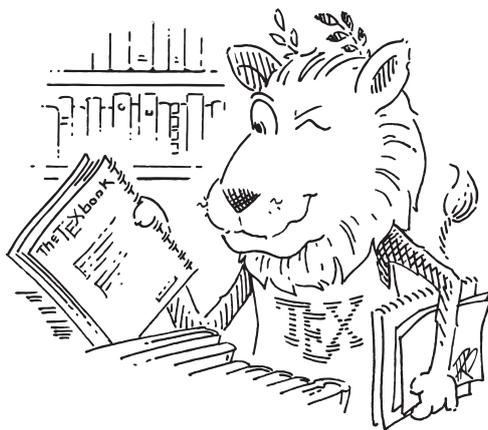
Phylotypes	Number of sequences					Phylum	Closest relatives ² (accession number)	Similarity (%)
	A	B	C	D	E			
Ni67	0	0	0	1	0	1	<i>Firmicutes</i>	
Ni209	0	0	0	1	0	1	<i>Firmicutes</i>	
Ni115	0	0	0	1	0	1	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium xinjiangensis</i> (DQ923131)
Ni250	0	0	0	1	0	1	<i>Actinobacteria</i>	
Ni203	0	0	0	1	0	1	<i>Bacteroidetes</i>	bacterium clone EV818CFSSAHH221 (DQ337021)
Ni26	0	0	0	1	0	1	<i>Chloroflexi</i>	<i>Sphaerobacter thermophilus</i> (AJ420142)
Ni150	0	0	0	1	0	1	<i>Thermotogae</i>	bacterium clone : OTU-B1 (AB428524)
NE10	0	0	0	0	1	1	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i> sp. PML14 (EF165014)
NE20	0	0	0	0	1	1	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i> sp. 171544 (AF071856)
NE93	0	0	0	0	1	1	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i> sp. TAT105 (AB066342)
NE53	0	0	0	0	1	1	<i>Firmicutes</i>	bacterium clone 2G4-24 (EU160322)
NE68	0	0	0	0	1	1	<i>Firmicutes</i>	bacterium clone F12 1H FF (EF682920)
NE25	0	0	0	0	1	1	<i>Firmicutes</i>	<i>Carnobacterium</i> sp. LV62 :W1 (AF076637)
NE77	0	0	0	0	1	1	<i>Firmicutes</i>	<i>Planomicrobium</i> sp. 0423 (EU036220)
NE92	0	0	0	0	1	1	<i>Firmicutes</i>	<i>Sporosarcina</i> sp. D51 (EU204977)
NE141	0	0	0	0	1	1	<i>Firmicutes</i>	
NE146	0	0	0	0	1	1	<i>Firmicutes</i>	
NE07	0	0	0	0	1	1	<i>Actinobacteria</i>	bacterium clone fc09 (DQ206920)
NE32	0	0	0	0	1	1	<i>Actinobacteria</i>	<i>Brevibacterium stationis</i> (AJ620367)
NE147	0	0	0	0	1	1	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium</i> sp. M41 (EF513640)
NE83	0	0	0	0	1	1	<i>Actinobacteria</i>	<i>Micromonospora echinaurantiaca</i> (X92618)
NE74	0	0	0	0	1	1	<i>Bacteroidetes</i>	bacterium clone 101-172 (EU133149)
NE152	0	0	0	0	1	1	<i>Bacteroidetes</i>	bacterium clone : SC-132 (AB255108)
NE119	0	0	0	0	1	1	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Algoriphagus dokdonensis</i> (DQ178979)
	0	0	0	0	1	1	<i>Bacteroidetes</i>	Bacteroidetes bacterium clone (DQ450752)
	0	0	0	0	1	1	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Chryseobacterium</i> sp. clone ChsT2 (AY621830)

Phylotypes	Number of sequences					Phylum	Closest relatives ² (accession number)	Similarity (%)
	A	B	C	D	E			
NE06	0	0	0	0	1	1	<i>Bacteroidetes</i> <i>Potato plant root</i> (AJ252719) <i>Spingobacterium sp. QMT3-2 (EU216022)</i>	96 95
NE73	0	0	0	0	1	1	<i>Bacteroidetes</i>	
NE116	0	0	0	0	1	1	β - <i>Proteobacteria</i> beta proteobacterium clone AKYG459 (AY922019)	97
NE122	0	0	0	0	1	1	β - <i>Proteobacteria</i> bacterium clone C7-DM-12 (DQ082889) <i>Zoogloea sp.</i> (ZSU63957)	99 95
NE14	0	0	0	0	1	1	γ - <i>Proteobacteria</i> <i>Acinetobacter sp.</i> 'Mali 41' (AY211135)	97
NE90	0	0	0	0	1	1	γ - <i>Proteobacteria</i> bacterium clone RL185 aaj69b04 (DQ824518) <i>Acinetobacter sp.</i> 'Mali 41' (AY211135)	97 97
NE16	0	0	0	0	1	1	α - <i>Proteobacteria</i> <i>Paracoccus sp.</i> SMCC G910 (EU446145)	97
NE17	0	0	0	0	1	1	<i>Gemmatimonadetes</i>	
NE79	0	0	0	0	1	1	TM7	

¹ Sum of sequences distributed in each phylotype

² Only sequences of closest relatives with similarity percentage above 95% are presented

Ce document a été rédigé à l'aide de l'éditeur de texte TeXnicCenter et du logiciel de composition typographique L^AT_EX 2_ε.



Identification et dispersion des bioaérosols générés lors du compostage

Résumé :

Cette étude porte sur l'identification et la dispersion des bioaérosols générés sur les plates-formes de compostage et plus précisément lors du retournement des andains en cours de fermentation. L'analyse des bioaérosols émis sur cinq plates-formes, par des inventaires moléculaires (ADNr 16S et ADNr 18S), a permis de montrer la dominance de deux phyla bactériens *Firmicutes* et *Actinobacteria* et du phylum fongique *Ascomycota*. En comparant la structure de la population microbienne des cinq bioaérosols, une signature a été identifiée. Dix phylotypes microbiens sont communs à au moins quatre bioaérosols. Deux sont présents dans les cinq bioaérosols : NA07 appartenant à l'espèce *Saccharopolyspora rectivirgula* et représentant 7% des séquences bactériennes totales et EQ07 affiliée à *Thermomyces* (49% des séquences fongiques). Un second phylotype bactérien, NC38, affilié à la famille des *Thermoactinomycetaceae* a été sélectionné du fait qu'il n'ait été identifié que dans le compost. Des systèmes de PCRq ont été développés pour quantifier ces trois indicateurs potentiels. Ces derniers ont été validés expérimentalement par des mesures sur sites industriels. Lors d'une activité de retournement, la concentration des indicateurs est supérieure à leur niveau basal dans l'air ("bruit de fond"). La dispersion des bioaérosols a ensuite été caractérisée en utilisant plusieurs méthodologies, dont les trois indicateurs conçus.

Les indicateurs présentent des profils de dispersion différents d'où l'intérêt de les coupler afin d'obtenir une meilleure vision de la dispersion des bioaérosols de compostage.

Mots clés : Bioaérosol, compost, fermentation, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Ascomycota*, indicateurs, PCRq, inventaires moléculaires

Identification and dispersal of composting bioaerosols emitted on composting platforms

Abstract:

The aim of this work was to analyze the diversity and the dispersal of composting bioaerosol emitted during the turning of compost windrows in thermophilic phase on composting platforms. The study of the microbial diversity of aerosols emitted on five composting plants was realized by 16S and 18S rDNA molecular inventories. Two bacterial phyla *Firmicutes* and *Actinobacteria* and one fungal phylum *Ascomycota* dominated. A common microbial signature emerged from the five composting bioaerosols: ten microbial phylotypes (seven bacterial and three fungal) were common to at least four bioaerosols. Two have been identified in five bioaerosols: NA07 belonging to the species *Saccharopolyspora rectivirgula*, and representing 7% of total number of bacterial sequences, and EQ05, affiliated to *Thermomyces* (49% of total number of fungal sequences). A second bacterial phylotype, NC38, affiliated to the *Thermoactinomycetaceae* family, was selected because it was identified only in the compost biotope. qPCR systems were then designed for each phylotype. Measurements performed on industrial composting sites validated the use of these microorganisms as indicators of composting bioaerosols. The dispersal of composting bioaerosols was then characterized using the three indicators developed.

Key words: Bioaerosol, compost, thermophilic phase, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Ascomycota*, indicators, qPCR, molecular inventories