



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Jodelle Degois

**Diversité microbienne dans les bioaérosols émis dans les centres
de tri des déchets**

Le 8 février 2018

Membres du jury :

Rapporteurs :

Françoise LUCAS	Professeur, Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbains, Université Paris-Est Créteil Val de Marne, Créteil
Anne-Mette MADSEN	Senior Researcher, National Research Centre for the Working Environment, Copenhagen, Denmark

Examineurs :

Pierre LE CANN	Professeur, Laboratoire d'étude et de recherche en environnement et santé (LERES), Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique, Rennes
Pierre LEBLOND	Professeur, Université de Lorraine, UMR INRA 1128 DynAMic, directeur de thèse
Cyril BONTEMPS	Maître de conférences, Université de Lorraine, UMR INRA 1128 DynAMic, co-directeur de thèse
Philippe DUQUENNE	Responsable d'études, INRS, Vandoeuvre, co-directeur de thèse



**Laboratoire DynAMic –UMR UL/INRA 1128 – IFR EFABA Faculté des Sciences et Technologies -
54506 Vandoeuvre-lès-Nancy CEDEX**

« Je travaille à être heureux, c'est le plus beaux des métiers »

Robert Lassus, 1981

Je dédie cette thèse à LS et MM, les deux grandes amours de ma vie

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée en partenariat avec l'INRS et l'Université de Lorraine. A ce titre, je voudrais remercier Benoit Courrier d'avoir permis le déroulement de cette thèse au sein du département de métrologie des polluants de l'INRS.

Je voudrais remercier Peter Görner puis Olivier Witschger (responsables de laboratoire) de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de métrologie des aérosols et de m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Mes remerciements vont également à Philippe Duquenne (co-directeur) tant pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordées, que pour la fructueuse collaboration qu'il a su faire germer au fil de ces années de travail.

Je tiens également à remercier Cyril Bontemps (co-directeur), Pierre Leblond (directeur) pour avoir acceptés d'encadrer cette thèse, pour leurs conseils et les améliorations qu'ils ont apportés à ce travail.

Je tiens également à remercier Françoise Lucas, Anne-Mette Madsen et Pierre Le Cann de m'avoir fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury de cette thèse. Mes remerciements vont également à Enric Robine, Nathalie Wéry et Damien Blaudez qui ont suivi l'avancée de ce travail lors des différents comités de thèse et dont les conseils m'ont été profitables.

Un grand merci à Xavier Simon pour son aide lors des essais expérimentaux et sa participation à la campagne de prélèvement ainsi que pour ses conseils et sa bonne humeur.

Je voudrais remercier Frédéric Clerc pour le soutien statistique qu'il m'a apporté, pour son implication, sa disponibilité.

Je souhaite également remercier Catherine Coulais, Cécile Dziurla, Véronique Koehler pour la formation technique et leur aide lors de l'analyse des différents prélèvements ainsi que Olivier Deloras, Alexis Boivin, Raphaël Payet et Sébastien Bau pour leur aide scientifique et technique dans des domaines divers. Merci à Lilia pour son implication au cours de son stage.

Merci à Mathieu Dziurla (et le département Epidémiologie en entreprise) ainsi que Clotilde Hecht (et les membres d'ULM) pour m'avoir prêté le matériel nécessaire à la campagne de prélèvements.

Un grand merci à Jérôme Schmitt d'avoir permis la campagne de prélèvement sans laquelle cette thèse n'existerait pas.

D'une manière plus générale, merci à tous ceux qui ont partagé mon quotidien durant ces trois dernières années (et plus particulièrement le laboratoire de métrologie des aérosols) et qui ont fait de ce doctorat une aventure humaine.

Un grand à Marine, Stéphane, Océane, JS, Gaël pour tous les bons moments que nous avons passé, pour les soirées remplies de rire et de bonne humeur.

A Charlotte, Coline, Lucie, Marie-Lucie, amies de toujours (et à jamais). Merci de m'avoir sortie des méandres de la thèse par moments et d'avoir permis de découvrir cette formidable nation qu'est l'Ecosse.

Un grand merci à Bernard et Astrid pour m'avoir permis de m'évader le temps des week-ends en Moselle.

Un grand merci à mes parents pour m'avoir soutenue dans mes longues études, d'avoir cru en moi dans les moments difficiles, de m'avoir encouragée, toujours.

A Justine dont les plus belles œuvres ont orné mon bureau et qui a apporté en plus de son soutien, une touche artistique à mon quotidien.

Et pour terminer, merci à Mathieu pour sa patience, sa compréhension, à son soutien inconditionnel. Merci d'avoir partagé avec moi les moments de joie comme de doute et de m'avoir assistée au quotidien. Merci d'être là.

RESUME

Le nombre de centres de tri est en constante augmentation en France et les activités de tri des déchets constituent une source d'émission importante de bioaérosols auxquels les salariés sont exposés. L'exposition aux bioaérosols peut entraîner des effets néfastes sur la santé tels que des rhinites, de l'asthme ou des pneumopathies d'hypersensibilité. Cependant, la composition complexe des bioaérosols empêche encore d'identifier les agents microbiens responsables des effets qui ont été observés sur la santé ainsi que leur rôle précis dans les symptômes. Ainsi, l'amélioration des connaissances concernant la composition précise des bioaérosols auxquels sont exposés les travailleurs permettraient une meilleure compréhension des risques biologiques professionnels. Les données actuelles décrivent au mieux les bioaérosols par la concentration et la composition en microorganismes cultivables. Les méthodes dépendantes de la culture sont les techniques historiques pour les mesures microbiologiques en entreprise. Toutefois, elles sont connues pour sous-estimer la biodiversité microbienne des échantillons de bioaérosols.

Dans ce contexte, les objectifs de la thèse sont *i)* concevoir et caractériser une méthode d'analyse de la biodiversité dans les bioaérosols ; *ii)* évaluer la biodiversité, bactérienne et fongique, dans les bioaérosols émis dans des entreprises du secteur du tri des déchets ; *iii)* identifier les principaux déterminants de la diversité microbienne dans les entreprises investiguées. Une première étape a été de définir une méthode permettant de mesurer la biodiversité dans les bioaérosols et de vérifier la faisabilité de l'utilisation des techniques de séquençage à haut débit (NGS) pour étudier la biodiversité bactérienne et fongique des bioaérosols émis en environnements professionnels et plus particulièrement en centre de tri des déchets. Dans un deuxième temps, le processus analytique a été caractérisé sur des bioaérosols générés en laboratoire. La biodiversité microbienne, sa variabilité ainsi que les paramètres environnementaux pouvant l'impacter ont ensuite été investigués pendant un an dans un centre de tri.

Les résultats montrent que les NGS représentent une bonne alternative aux techniques de culture traditionnellement utilisées pour l'étude de la biodiversité. Cependant les outils analytiques tels que la méthode d'extraction d'ADN, la cible de séquençage ou encore les étapes de bio-informatique ont un impact sur les résultats de biodiversité. Il est donc important de standardiser le processus de mesure pour les études comparatives. La campagne de prélèvements réalisée à grande échelle a permis de mettre en évidence la grande complexité des bioaérosols émis en centre de tri que ce soit pour la composition bactérienne ou pour la composition fongique. Des variations importantes en termes de richesse spécifique et d'abondance relative des taxons ont également été observées. Si la temporalité a pu en partie expliquer les variations de biodiversité fongique, aucun paramètre n'a pu expliciter les variations de biodiversité bactérienne. Ces résultats ont mis en évidence le caractère multifactoriel de la variation et de la composition des bioaérosols émis en environnement professionnel. La thèse a permis la collecte d'un grand nombre d'échantillons et d'une quantité importante de nouvelles données de biodiversité microbienne dans les bioaérosols et constituent les premiers résultats publiés de biodiversité étudiée par séquençage à haut débit dans le secteur du tri des déchets.

ABSTRACT

The number of the waste sorting plants constantly increases in France and the waste sorting activities are a source of bioaerosol exposure for the workers. The bioaerosols can induce several health disorders such as rhinitis, asthma or hypersensitivity pneumonitis. However, the complexity of the bioaerosol doesn't allow the identification of microbial agents responsible for the observed health effects and their precise role in the related symptoms. Thus, improving the knowledge about the composition to which the workers are exposed would lead to a better understanding of occupational biological risk. Exposure data on this field of study are missing. They mainly report the levels of culturable microorganisms and more rarely the composition of bioaerosols by identification of colonies after culture. Culture-dependent methods are historical techniques for microbiological measurements in companies. However, they are known to underestimate the microbial biodiversity of bioaerosol samples.

In this context, the objectives of the thesis are: *i)* to develop and characterize a method for biodiversity analysis of bioaerosols; *ii)* to assess the biodiversity, bacterial and fungal, in bioaerosols emitted by companies in the waste sorting sector; *iii)* identify the environmental parameters impacting the microbial diversity in the investigated plant (climatic conditions, intensity of activity, nature of activity, influence of sampling day, etc.). A first step was to design a method for measuring biodiversity in bioaerosols and to assess the feasibility of high throughput sequencing (NGS) techniques to study the bacterial and fungal biodiversity of bioaerosols emitted in occupational environments, more particularly in waste sorting center. In a second step, the analytical process was characterized on bioaerosols generated in the laboratory. The microbial biodiversity and its variability were then investigated for one year in a second sorting center. Environmental parameters impacting biodiversity outcomes were also studied.

The results showed the NGSs are a good alternative method to the historical technics for the assessment of microbial diversity in occupational bioaerosols. However, analytical tools such as the DNA extraction method, the genetic target for the sequencing or the bioinformatics steps have an impact on the biodiversity results. It is therefore important to standardize the measurement process for comparative studies. The large-scale sampling campaign revealed the high complexity of the bioaerosols emitted in the sorting center for bacterial and fungal biodiversity. Significant variations in species richness and relative abundance of taxa were also observed. Although temporality may have partly explained variations in fungal biodiversity, no parameter could explain the variability of bacterial biodiversity. These results highlighted the multifactorial origin of the variation and composition of bioaerosols emitted in occupational environment. The present work provided the collection of a large number of samples and an important amount of new microbial biodiversity data in bioaerosols and the first published biodiversity results studied by high throughput sequencing in the waste sorting sector.

Table des matières

TABLE DES FIGURES.....	15
TABLE DES TABLEAUX.....	17
LISTE DES ABREVIATIONS	19
PARTIE 1: CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE.....	23
1. LES BIOAEROSOLS	23
2. BIOAEROSOLS ET SANTE DES TRAVAILLEURS	24
3. MESURE DES EXPOSITIONS PROFESSIONNELLES	25
3.1 METHODES DE PRELEVEMENT DES BIOAEROSOLS.....	25
3.1.1 Généralités	25
3.1.2 Prélèvement par impaction	26
3.1.3 Prélèvement sur filtre	28
3.2 ANALYSE QUANTITATIVE DES PRELEVEMENTS DE BIOAEROSOLS.....	28
3.2.1 Méthodes par mise en culture.....	29
3.2.2 Dosage des endotoxines et des (1,3)- β -D-glucanes par la méthode au LAL.....	29
3.2.3 Mesure par PCR en temps réel (qPCR).....	30
3.2.4 Autres méthodes	30
4. LA BIODIVERSITE.....	31
4.1 LA CLASSIFICATION DU VIVANT.....	31
4.2 DEFINITION DE LA BIODIVERSITE.....	31
4.3 CARACTERISATION DE LA BIODIVERSITE.....	32
4.3.1 Calcul de l' α diversité.....	32
4.3.2 Calcul de la β diversité.....	33
4.3.3 Calcul de la γ diversité	33
5. METHODES D'ANALYSE DE LA BIODIVERSITE MICROBIOLOGIQUE	34
5.1 METHODES D'ANALYSE CULTURE-DEPENDANTES : IDENTIFICATION D'ISOLATS	34
5.1.1 Identification macroscopique et microscopique.....	34
5.1.2 Identification des isolats par des tests biochimiques	34
5.1.3 Identification par méthodes chimiques	35
5.1.4 Méthodes de biologie moléculaire	35
5.2 METHODES D'ANALYSE CULTURE-INDEPENDANTES	35
5.2.1 Extraction d'ADN	36
5.2.2 Marqueurs génétiques et analyse de la biodiversité	36
5.2.3 Etude et comparaison de communautés.....	37
5.2.4 Métagénomique et séquençage de deuxième génération (NGS).....	38
5.2.5 Synthèse des méthodes utilisées pour étudier la biodiversité dans les bioaérosols	41
6. EXPOSITION PROFESSIONNELLE AUX BIOAEROSOLS DANS LE SECTEUR DU TRAITEMENT DES DECHETS 45	
6.1 SECTEUR DU TRAITEMENT DES DECHETS.....	45
6.2 ORGANISATION D'UN CENTRE DE TRI.....	45
6.3 EXPOSITION AUX BIOAEROSOLS DANS LE SECTEUR DE TRAITEMENT DES DECHETS	46
OBJECTIFS DE LA THESE	51

DEROULEMENT DES TRAVAUX	52
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	54
PARTIE 2: ESSAI PRELIMINAIRE DE FAISABILITE DU PROCESSUS DE PRELEVEMENTS ET D'ANALYSE D'ECHANTILLONS DE BIOAEROSOLS	63
1. RESUME	63
2. ARTICLE 1: FIRST METAGENOMIC SURVEY OF THE MICROBIAL DIVERSITY IN BIOAEROSOLS EMITTED IN WASTE SORTING PLANTS.	65
PARTIE 3: DEVELOPPEMENT METROLOGIQUE DU PROCESSUS D'ANALYSE DE LA BIODIVERSITE SUR DES BIOAEROSOLS GENERES EN LABORATOIRE.....	87
1. RÉSUMÉ	87
2. ARTICLE 2: USE OF A FUNGAL BIOAEROSOL CONSORTIUM TO ASSESS ANALYTICAL BIASES IN BIODIVERSITY MEASUREMENTS	89
PARTIE 4: SUIVI SUR UN AN DE LA BIODIVERSITE MICROBIENNE DANS LES BIOAEROSOLS EMIS DANS UN CENTRE DE TRI.....	109
1. RESUME	109
2. ARTICLE 3 : ONE YEAR FOLLOW-UP OF MICROBIAL DIVERSITY IN BIOAEROSOLS IN A FRENCH WASTE SORTING PLANT	111
PARTIE 5: IMPACT DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX SUR LA BIODIVERSITE MICROBIENNE EMISE DANS UN CENTRE DE TRI DES DECHETS	133
1. RESUME	133
2. ARTICLE 4 : IMPACT OF ENVIRONMENTAL PARAMETERS ON MICROBIAL BIODIVERSITY OF BIOAEROSOLS EMITTED IN A WASTE SORTING PLANT.....	135
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	157

Table des figures

FIGURE 1 CONVENTION DES DIFFERENTES FRACTIONS DE PARTICULES EN SUSPENSION DANS L'AIR (FIGURE EXTRAITE DE LA NORME AFNOR NF X43-276). A. DEFINITION DES FRACTIONS PAR LE POURCENTAGE DE PARTICULES PENETRANT DANS LES VOIES EN FONCTIONS DE LA TAILLE DES PARTICULES B. POURCENTAGE DES PARTICULES DEPOSEES DANS LES VOIES RESPIRATOIRES EN FONCTION DE LEUR TAILLE.	23
FIGURE 2 EXEMPLES DE TROIS IMPACTEURS : A. IMPACTEUR MONOETAGE : MAS 100, B. IMPACTEUR EN CASCADE ANDERSEN 6 ETAGES (VIALE), C. IMPACTEUR EN CASCADE MARPLE [XAVIER SIMON/PHILIPPE DUQUENNE, INRS].	27
FIGURE 3 EXEMPLE DE DEUX « IMPINGERS », PRELEVEMENT EN VOIE LIQUIDE : A. CIP 10 B. SKC BIOSAMPLER® [XAVIER SIMON/PHILIPPE DUQUENNE, INRS].	27
FIGURE 4 EXEMPLES DE MATERIEL DE PRELEVEMENT PAR FILTRATION : A. CASSETTE DE 37 MM DE DIAMETRE, B. BUTTON SAMPLER, C. IOM [XAVIER SIMON/PHILIPPE DUQUENNE/JODELLE DEGOIS, INRS].	28
FIGURE 5 A. LES DIFFERENTES ETAPES D'UN CYCLE DE TEMPERATURE DE PCR, A 95°C SE PRODUIT LA DENATURATION DES DEUX BRINS D'ADN, LES AMORCES VIENNENT ENSUITE S'HYBRIDER A L'ADN SIMPLE BRIN A UNE TEMPERATURE SPECIFIQUE A CHAQUE AMORCE. L'ELONGATION DES BRINS D'ADN SE PRODUIT A 70°C, TEMPERATURE OPTIMALE DE LA REACTION ENZYMATIQUE. B. COURBE DE REPONSE DE LA PCR EN TEMPS REEL. LE C _T EST CORRESPOND AU NOMBRE MINIMUM DE CYCLES POUR QUE LE SIGNAL FLUORESCENT SE DISSOCIE DU BRUIT DE FOND. FIGURES ISSUES DE KUBISTA <i>ET AL.</i> , 2006.	30
FIGURE 6 CATEGORIES HIERARCHISEES DU VIVANT DEFINIES PAR CARL VON LINNE.	31
FIGURE 7 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS TYPES DE DIVERSITE. (IMAGE TIRÉE DE : HTTPS://IMAGE.SLIDESHARECDN.COM/T10-BURGESS-FIRESUB-TROPICALWOODLANDS-150603053940-LVA1-APP6892/95/BUSHFIRECONF2015-10-MANAGING-FIRE-FOR-NATURE-CONSERVATION-IN-SUBTROPICAL-WOODLANDS-4-638.JPG?CB=1434967736)	32
FIGURE 8 A. LA REGION ITS EST ENCADREE PAR LA PETITE SOUS-UNITE RIBOSOMIQUE (SSU : 18S) ET LA GRANDE SOUS-UNITE- RIBOSOMIQUE (LSU : 26S). LES REGIONS ITS1 ET ITS2 SONT SEPARÉES PAR LE 5,8S. CES REGIONS SONT LES MARQUEURS DES EUCARYOTES, LES ITS SONT D'AVANTAGE DES MARQUEURS FONGIQUES. LA FIGURE EST ISSUE DE BELLEMAIN <i>ET AL.</i> (2101) B. REGIONS CODANT LES ARN RIBOSOMIAUX, ELLES SONT CONSTITUEES DE 10 REGIONS VARIABLES. LES REGIONS CODANT L'ARNR 16S SONT SOUVENT UTILISEES COMME MARQUEUR BACTERIEN POUR LES ANALYSES DE BIODIVERSITE. FIGURE ISSUE DE GURTNER <i>ET AL.</i> (1996).	37
FIGURE 9 PREPARATION DES BIBLIOTHEQUES. A. POUR LES PLATES-FORMES TECHNOLOGIES 454. LES FRAGMENTS D'ADN SONT HYBRIDES SUR DES BILLES QUI SONT ENSUITE REPARTIES DANS DES VESICULES D'EMULSION EAU/HUILE OU LA REACTION D'AMPLIFICATION SE PRODUIT. A LA FIN DE CETTE REACTION, LES VESICULES SONT DENATUREES, LES SEQUENCES NON HYBRIDEES SUR LES BILLES SONT ELIMINEES PAR L'AJOUT D'AGENT DENATURANT. B. POUR LA PLATE-FORME ILLUMINA, LES ADAPTATEURS SONT FIXES SUR UNE PLAQUE, A LA FIN DE L'AMPLIFICATION, LES FRAGMENTS SONT REGROUPES EN CLUSTERS.	39
FIGURE 10 PRINCIPE DU PYROSEQUENÇAGE PAR LA TECHNOLOGIE 454.	40
FIGURE 11 PRINCIPE DU SEQUENÇAGE PAR LA TECHNOLOGIE ILLUMINA.	40
FIGURE 12 ORGANISATION GENERALE D'UN CENTRE DE TRI DES DECHETS. LES ETAPES EN VERT SONT REALISEES AU SOL AVEC PARFOIS L'INTERVENTION DE VEHICULES, LES ETAPES EN BLEU PLEIN SONT MANUELLES ET EXECUTEES EN HAUTEUR. LES ETAPES DE TRI CERCLEES BLEUES SONT AUTOMATISEES ET EN HAUTEUR. POUR FINIR, L'ETAPE EN VIOLET PEUT ETRE MANUELLE OU AUTOMATISEE EN FONCTION DES CENTRES DE TRI. EN REGLE GENERALE, LES ETAPES MANUELLES SONT EXECUTEES SUR DES PLATES-FORMES EN HAUTEUR POUR ETRE ISOLEES DES VEHICULES AU SOL.	46
FIGURE 13 BACTERIAL BIODIVERSITY AT THE PHYLUM RANK IN BIOAEROSOLS FROM THE WSP. BIOAEROSOL SAMPLES WERE COLLECTED IN THE SORTING CABIN (SC) AND IN THE OUTDOOR REFERENCE (OR). FOR PRACTICAL REASONS, ONLY THE MEAN OF SEQUENCING DATA FROM SC1, SC2 AND SC3 ARE PRESENTED.	70
FIGURE 14 BACTERIAL BIODIVERSITY AT THE FAMILY RANK IN BIOAEROSOLS FROM THE WSP.	71
FIGURE 15 FUNGAL BIODIVERSITY AT THE GENUS RANK IN BIOAEROSOLS FROM THE WSP.	72
FIGURE 16 DIAGRAM OF THE TEST RIG USED TO GENERATE AND SAMPLE THE EXPERIMENTAL BIOAEROSOLS. (Q _G = BUBBLING AIRFLOW; Q _E = ENTRAINING AIRFLOW; T = TEMPERATURE OF AIR; RH = RELATIVE HUMIDITY OF AIR; CFC = CLOSED-FACE CASSETTE)	91

FIGURE 17 SIZE DISTRIBUTION OF AIRBORNE PARTICLES IN THE BIOAEROSOL GENERATED FROM A LIQUID CONSORTIUM OF THE 4 FUNGAL STRAINS. THE AERODYNAMIC DIAMETER WAS MEASURED USING TSI™ APS 3321.	94
FIGURE 18 DNA CONCENTRATION MEASURED BY QPCR IN THE FUNGAL CONSORTIA SAMPLES. THE VALUES REPRESENTED THE AVERAGE AND THE ERROR BARS INDICATED THE CONFIDENCE INTERVAL AT 95%.....	95
FIGURE 19 FUNGAL BIODIVERSITY IN THE BIOAEROSOL CONSORTIA FOUND USING SEVERAL METHODS. THE VALUE OF EACH FUNGAL PROPORTIONS CORRESPONDED TO THE MEAN OF PROPORTIONS FOUND IN THE THREE BIOAEROSOL CONSORTIA.	96
FIGURE 20 FUNGAL BIODIVERSITY IN THE BIOAEROSOL CONSORTIA AND SUSPENSION CONSORTIA FOUND USING CULTURE AND ITS2 SEQUENCING. THE VALUE OF EACH FUNGAL PROPORTIONS CORRESPONDED TO THE MEAN OF PROPORTIONS FOUND IN THE THREE BIOAEROSOL OR SUSPENSION CONSORTIA.	97
FIGURE 21 BACTERIAL BIODIVERSITY AT THE PHYLUM LEVEL IN THE SAMPLES COLLECTED IN :A. THE WASTE UNLOADING AREA, B. IN THE FIRST-SORTING CABIN, C. IN THE NON-EXPOSED INDOOR REFERENCE.	116
FIGURE 22 BACTERIAL BIODIVERSITY AT THE GENUS LEVEL IN BIOAEROSOLS COLLECTED IN THE UNLOADING WASTE AREA, IN THE FIRST-SORTING CABIN AND IN THE INDOOR REFERENCE (* NO DATA COLLECTED FOR THE SAMPLES).	117
FIGURE 23 FUNGAL BIODIVERSITY AT THE PHYLUM RANK IN BIOAEROSOLS COLLECTED IN: A. THE UNLOADING WASTE AREA, B. IN THE FIRST SORTING CABIN, C. IN THE NON-EXPOSED INDOOR REFERENCE.....	118
FIGURE 24 FUNGAL BIODIVERSITY AT THE GENUS LEVEL IN BIOAEROSOLS EMITTED IN: THE UNLOADING AREA, THE FIRST-SORTING CABIN AND IN THE INDOOR REFERENCE (* NO DATA COLLECTED FOR THE SAMPLES).....	119
FIGURE 25 SCHEMATIC ORGANIZATION OF THE WASTE SORTING PLANT AND LOCATION OF THE SAMPLING LOCATIONS.....	137
FIGURE 26 TEMPERATURES MEASURED AT EACH SAMPLING POINTS: A. IN THE CABINS, B. IN THE HALL. IN EACH GRAPH, THE TEMPERATURE MEASURED IN THE INDOOR REFERENCE WAS REPRESENTED.....	141
FIGURE 27 TEMPERATURES MEASURED AT EACH SAMPLING POINTS: A. IN THE CABINS, B. IN THE HALL. IN EACH GRAPH, THE RELATIVE HUMIDITY MEASURED IN THE INDOOR REFERENCE WAS REPRESENTED.....	142
FIGURE 28 SORENSSEN-DICE COEFFICIENT FOR A. BACTERIAL AND B. FUNGAL BIODIVERSITY. THIS COEFFICIENT REPRESENTS A DISTANCE OF COMMUNITY COMPOSITION BETWEEN A SAMPLING POINT AND THE INDOOR REFERENCE. MORE THE COEFFICIENT IS HIGH AND MORE THE TWO SAMPLES HAD A SIMILAR COMPOSITION.	144
FIGURE 29 BAYESIAN NETWORK ANALYSIS FOR THE FUNGAL SAMPLES. A. THE FUNGAL SAMPLES WERE CLUSTERING DEPENDING ON THEIR COMMUN GENERA INTO NODES, THE LETTER F REPORTS TO FUNGAL SAMPLE, THE FIRST NUMBER TO THE MONTH AND THE LAST NUMBER TO THE SAMPLING LOCATION B. THE SEVERAL NODES WERE CLUSTERING DEPENDING THEIR SIMILARITY OF FUNGAL COMPOSITION.....	146
FIGURE S 1 SIZE DISTRIBUTION FOR PARTICLES GENERATED MEASURED WITH GRIMM® G1109. EXAMPLES FOR THE 4-STRAINS MIXING (A) AND FOR <i>WALLEMIA MELICOLLA</i> (B).	104
FIGURE S 2 SIZE DISTRIBUTIONS FOR PARTICLES GENERATED USING THE 4-STRAINS MIXING LIQUID CULTURES.	105
FIGURE S 3 SIZE DISTRIBUTIONS AND SIZE DISTRIBUTIONS PARAMETERS FOR PARTICLES GENERATED USING A LIQUID CULTURE OF A. <i>WALLEMIA MELICOLLA</i> , B. <i>ASPERGILLUS NIGER</i> , C. <i>PENICILLIUM BREVICOMPACTUM</i> AND D. <i>CLADOSPORIUM CLADOSPOROIDES</i> .THE AERODYNAMIC DIAMETER MEASURED WAS MEASURED USING TSI™ APS 3321.	106
FIGURE S 4 BACTERIAL BIODIVERSITY AT THE PHYLUM LEVEL IN THE SAMPLES COLLECTED IN :A. THE SORTING CABIN, B. NEAR THE PRESS, C. NEAR THE PRESS AND THE STORAGE BALES AREA.	128
FIGURE S 5 BACTERIAL BIODIVERSITY IN BIOAEROSOLS COLLECTED IN THE SORTING CABIN, NEAR THE SHREDDER AND NEAR THE PRESS/ STORAGE BALES AREA (* NO DATA COLLECTED FOR THE SAMPLES).	129
FIGURE S 6 FUNGAL BIODIVERSITY AT THE PHYLUM RANK IN BIOAEROSOLS COLLECTED IN: A. THE SORTING CABIN, B. NEAR THE SHREDDER, C. NEAR THE PRESS AND THE BALES STORAGE AREA.....	129
FIGURE S 7 FUNGAL BIODIVERSITY AT THE GENUS LEVEL IN BIOAEROSOLS EMITTED: IN THE SORTING CABIN, NEAR THE SHREDDER AND NEAR THE PRESS AND THE BALES STORAGE AREA (* NO DATA COLLECTED FOR THE SAMPLES).....	130
FIGURE S 8 EXAMPLE OF A BAYESIAN NETWORK WHOSE NODES REPRESENT THE MEASUREMENTS AND THOSE LINKS REPRESENT THE STATISTICAL CORRELATIONS BETWEEN NODES.	152
FIGURE S 9 NOTCHED BOXPLOT REPRESENTING THE DISPERSION OF A. THE BACTERIAL SHANNON INDEX, B. THE FUNGAL SHANNON INDEX OVER THE YEAR.....	153
FIGURE S 10 BAYESIAN NETWORK ANALYSIS FOR THE BACTERIAL SAMPLES.....	154

Table des tableaux

TABLE 1 MESURE DE LA BIODIVERSITE MICROBIENNE DANS LES BIOAEROSOLS VIA DIFFERENTES METHODES D'IDENTIFICATION.....	42
TABLE 2 MESURES DES PARTICULES BIOLOGIQUES DANS LE SECTEUR DU TRAITEMENT DES DECHETS AVEC DEUX STRATEGIES DE PRELEVEMENT : PRELEVEMENTS D'AMBIANCE (A) ET PRELEVEMENTS INDIVIDUEL (I). LES CONCENTRATIONS CORRESPONDENT A DES MOYENNES (MOY), A DES MEDIANES (MED) OU A UN NOMBRE TOTAL DE COLONIES DENOMBREES (NB UFC).....	48
TABLE 3 OVERVIEW OF HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING DATA OBTAINED FROM BIOAEROSOL SAMPLES TAKEN IN THE WSP.	69
TABLE 4 GENERAL GENERATION RUNS DATA.	95
TABLE 5 DESCRIPTION OF THE STATIONARY SAMPLING LOCATIONS IN THE WASTE SORTING PLANT.....	113
TABLE 6 OVERVIEW OF HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING DATA OBTAINED FROM BIOAEROSOL SAMPLES TAKEN IN THE WSP DURING THE YEAR OF SAMPLING.	115
TABLE 7 STATISTICAL DIFFERENCES BETWEEN ALPHA BIODIVERSITY INDEX (MANN-WITHNEY TEST).....	143
TABLE S 1 PROPORTION OF IDENTIFIED READS FROM BIOAEROSOL AT DIFFERENT TAXONOMIC RANKS IN SAMPLES TAKEN IN THE WSP.	79
TABLE S 2 BACTERIAL DIVERSITY AT THE FAMILY RANK (PROPORTION OF 16S rDNA READS).	79
TABLE S 3 BACTERIAL DIVERSITY AT THE GENUS RANK (PROPORTION OF 16S rDNA READS).....	81
TABLE S 4 FUNGAL BIODIVERSITY DETERMINING DATA IN THE SUSPENSIONS AND IN THE BIOAEROSOLS.	106
TABLE S 5 TEMPERATURE AND RELATIVE HUMIDITY MEASURED AT EACH SAMPLING POINTS DURING THE SAMPLING CAMPAIGN.	127
TABLE S 6 REPRESENTATION OF DATA USED.....	152

Liste des abréviations

ADEME: agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie
AFNOR : association française de normalisation
AFTOL: assembling the fungal tree of life (assembler l'arbre fongique de la vie)
APS: adenosine 5' phosphosulfate (dans l'introduction)
APS: aerodynamic particle sizer (calibreur de particules aérodynamique)
ATP: adenosine triphosphate
BLAST: basic local alignment tool (outil d'alignement local de base)
CFC: closed face cassette (cassette fermée)
CFU : colony forming unit (unité formant colonie)
C_N : concentration en nombre de particules
CIP 10-I : compteur individuel de particules sélecteur de la fraction inhalable
CIP 10-M : compteur individuel de particules dit « microbiologique »
CMAD : count median aerodynamic diameter (médiane du diamètre aérodynamique mesuré)
CMR : cancérogènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction
CT : cycle threshold (cycle seuil)
CV : coefficient de variation
D_{ae} : aerodynamic diameter (diamètre aérodynamique)
DGGE : denaturing gradient gel electrophoresis (électrophorèse sur gel en conditions dénaturantes)
ddNTP : dideoxynucleotide
dNTP : désoxynucléotide tri-phosphate
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay (dosage immuno-enzymatique)
FAME : fatty acid methyl ester (ester méthylique d'acides gras)
FNADE : fédération nationale des activités de la dépollution et de l'environnement
GC : gas chromatography (chromatographie en phase gazeuse)
H_{liq} : hauteur du film liquide
HPLC : high pressure liquid chromatography (chromatographie en phase liquide à haute performance)
IOM : institute of occupational medicine (échantillonneur par filtration)
ITS : internal transcribed spacer (spacer transcrit interne)
LSU : large subunit (ribosomal) (grosse sous-unité ribosomique)
LAL : limulus amebocyte lysate (lysate d'amibocyte de limule)
MEA : Malt Extract Agar (agar à l'extrait de malte)
NCBI : National Center for Biotechnology Information (centre national d'information sur la biotechnologie)
NGS : next generation sequencing (séquençage de deuxième génération)
OR : outdoor reference (référence extérieure)
OTU : operational taxonomic unit (unité taxinomique opérationnelle)
PCR : polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PLFA : phospholipid fatty acid (acide gras phospholipidique)
PFTE : polytétrafluoroéthylène
PVC : polychlorure de vinyle
Q_E : débit d'entraînement

Q_G : débit de génération
RBP : ribosomal data project (base de données ribosomiques)
RH : relative humidity (humidité relative)
SC : sorting cabin (cabine de tri)
SCSU : sole carbon source utilization (utilisation exclusive de sources de carbone)
SDS : dodécylsulfate de sodium
SSCP : single-strand conformation polymorphism (polymorphisme de la conformation simple brin)
SSU : small subunit (ribosomal) (petite sous-unité ribosomique)
TGGE : temperature gradient gel electrophoresis (électrophorèse sur gel avec un gradient de température)
t-RFLP : terminal restriction fragment length polymorphism (polymorphisme de la longueur de la chaîne terminale)
TSA : Trypticase™ Soy Agar (agar à base de trypticase et de soja)
UE : unité d'entoxine
UFC : unité formant colonie
VLEP : valeur limite d'exposition professionnelle
WSP : waste sorting plant (centre de tri des déchets)

Partie 1

Contexte
bibliographique

Partie 1: Contexte bibliographique

1. Les bioaérosols

Les aérosols sont définis comme étant des particules en suspension dans l'air. Les bioaérosols en constituent la partie biologique (AFNOR 2012). Ils peuvent être constitués d'organismes vivants ou endommagés : pollen, virus, cellules et spores bactériennes ou fongiques, mais également de fragments d'insectes ou de mammifères, ainsi que des composés cellulaires (endotoxines, ergostérol, mycotoxines, allergènes, (1,3)- β -D-glucanes) (Reponen *et al.*, 2011). Les particules biologiques aéroportées peuvent être caractérisées par plusieurs paramètres : leur taille et leur forme, leur concentration, leur surface, leur volume, leur distribution granulométrique... qui vont influencer sur le devenir des particules dans l'air, ainsi que leurs conditions de prélèvement. D'autres facteurs sont également déterminants sur ce devenir comme la présence de composés cellulaires, l'agrégation de particules biologiques avec d'autres particules, les conditions environnementales au moment du prélèvement. Parmi toutes les caractéristiques physiques des bioaérosols, le diamètre aérodynamique est très étudié. Il est défini comme étant le « Diamètre de la sphère de masse volumique de 1 g.cm^{-3} dont la vitesse limite de chute dans l'air calme est la même que celle de la particule, dans les mêmes conditions de température, de pression et d'humidité relative. » (AFNOR 2012). Il dépend de la taille, de la forme et de la masse volumique de la particule. En santé au travail, le risque lié à l'inhalation d'aérosols s'évalue en fonction de trois fractions définies de manières conventionnelles : fraction inhalable, fraction thoracique et fraction alvéolaire (figure 1.A). Plus une particule a un petit diamètre aérodynamique, plus elle va avoir une probabilité importante de pénétrer profondément dans les voies aériennes. La probabilité de dépôt dans les voies respiratoires n'est pas uniquement due au diamètre de la particule, mais également à différents mécanismes de dépôt : inertiels (par sédimentation ou impaction), via des phénomènes de diffusion ou des phénomènes électrostatiques. Par conséquent toutes les particules qui pénètrent dans les voies respiratoires ne s'y déposent pas (figure 1.B).

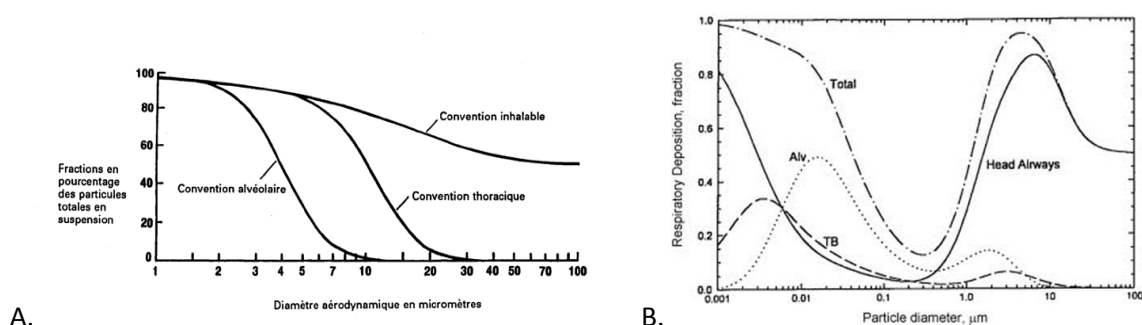


Figure 1 Convention des différentes fractions de particules en suspension dans l'air (figure extraite de la norme AFNOR NF X43-276). **A.** Définition des fractions par le pourcentage de particules pénétrant dans les voies en fonctions de la taille des particules **B.** Pourcentage des particules déposées dans les voies respiratoires en fonction de leur taille : Alv: région alvéolaire; TB: région trachéobronchiale (Figure extraite de Hinds (1999)).

Lors de mesure d'exposition, les appareils de mesure prélèvent les fractions contenant les particules qui sont susceptibles de pénétrer dans l'organisme. Le risque est ainsi majoré allant dans le sens de la prévention des maladies professionnelles. Les différentes fractions sont définies dans la norme NF X-43-276 (1993) :

- la fraction inhalable : fraction des particules totales en suspension dans l'air susceptibles d'être inhalées par le nez et par la bouche
- la fraction thoracique : fraction des particules inhalées qui pénètrent au-delà du larynx
- la fraction alvéolaire : fraction des particules qui pénètrent dans les voies aériennes non ciliées (bronchioles et alvéoles) (AFNOR 1993).

En métrologie des bioaérosols, la fraction inhalable est la plus investiguée en raison d'absence d'effet spécifique et de valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP).

2. Bioaérosols et santé des travailleurs

Les bactéries, les champignons ou les composés microbiens comme les endotoxines ou les (1,3)- β -D-glucanes ont été identifiés comme des vecteurs potentiels de maladies professionnelles (Douwes *et al.*, 2003 ; Eduard 2009). Différents secteurs d'activité ont été investigués lors des études épidémiologiques et le secteur du traitement des déchets est un des secteurs étudiés. Walser et son équipe ont recensé les études épidémiologiques rapportant des effets sur la santé des bioaérosols ainsi que leurs limites (Walser *et al.*, 2015). D'après un rapport du Royaume-Uni sur la santé des travailleurs de ce domaine d'activité, la prévalence de symptômes respiratoires, comme de la toux ou une défaillance respiratoire, est de 23 à 50% (Searl and Crawford 2012). Selon ce même rapport, les effets négatifs sur la santé pour les travailleurs de ce secteur apparaîtraient pour une concentration de 10^6 UFC.m⁻³ pour les bactéries cultivables totales. Les risques engendrés par l'exposition aux bioaérosols sont de quatre types : allergiques, cancérogènes, infectieux et toxiques (Cooley *et al.*, 1998). Les risques infectieux et cancérogènes ne seront pas développés ici, le secteur du traitement des déchets étant plus concerné par les risques allergiques et toxiques. Si les effets des bioaérosols sur la santé sont reconnus, le rôle précis de chaque agent biologique n'est pas connu, probablement en raison des symptômes qui sont non spécifiques ajouté à une causalité multifactorielle de l'apparition de ces symptômes. Le risque allergique est dû en partie aux champignons et bactéries thermophiles. En effet, les genres de champignons *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria* et *Penicillium* sont associés à des allergies respiratoires et notamment à de l'asthme allergique. Plus généralement, le risque allergique est associé à de l'asthme et des rhinites d'origines allergiques et à des pneumopathies d'hypersensibilité (Douwes *et al.*, 2003). Une étude réalisée dans une entreprise de traitement des déchets a montré qu'une exposition comprise entre 0 et 2.10^6 spores fongiques.m⁻³ est associée avec une augmentation des neutrophiles, des enzymes myeloperoxydases et des éosinophiles (Heldal *et al.*, 2003). Par ailleurs, dans le secteur du compostage, de fortes expositions à des particules biologiques sont associées à une augmentation des immunoglobulines de type G (IgG) des travailleurs exposés. Ceci n'est pas observé chez les travailleurs du secteur de la collecte des déchets probablement en raison d'une exposition moins importante (Bünger *et al.*, 2000). Le risque toxique peut résulter d'une exposition aux microorganismes ou à des composés microbiens comme les (1,3)- β -D-glucanes, les endotoxines et les mycotoxines. Ce risque est associé à des rhinites et de

l'asthme non allergiques, des irritations des voies aériennes supérieures et des bronchites chroniques. Pour les champignons, des symptômes respiratoires sévères seraient associés à des concentrations de 10^6 - 10^9 UFC.m⁻³ et une concentration de 10^3 - 10^6 spores.m⁻³ peut entraîner une irritation légère des voies aériennes supérieures. Pour les endotoxines, une exposition à 50 unités d'entoxine (EU).m⁻³ pourrait provoquer une toux sèche, une défaillance respiratoire, de la fièvre et une bronchoconstriction (Searl and Crawford 2012). L'inhalation de (1,3)- β -D-glucanes peut induire l'irritation des voies aériennes supérieures ou des muqueuses (Bønløkke *et al.*, 2006). D'autres effets ont été observés chez les salariés exposés : augmentation de la prévalence de l'atopie, production de myeloperoxydases, diminution du volume expiratoire exhalé. La relation dose/effets pour chaque risque et chaque constituant n'est pas établie à ce jour. En fonction des études, les symptômes ne surviennent pas pour les mêmes concentrations en particules biologiques (microorganismes cultivables, endotoxines...). Ceci est probablement dû à l'absence de standardisation dans la méthode de mesure (stratégie de prélèvement et méthodes d'analyse) entre ces différentes études (Duquenne *et al.*, 2012).

3. Mesure des expositions professionnelles

Malgré l'absence de VLEP et de compréhension de la relation dose/effet, il est reconnu que l'exposition aux bioaérosols a un impact sur la santé des travailleurs. Pour évaluer les niveaux d'exposition, prévenir des situations critiques ou attester le bon fonctionnement d'équipements de protection collective, des mesures de bioaérosols doivent être effectuées. Les méthodes de prélèvement ainsi que les techniques analytiques quantitatives les plus utilisées sont décrites dans la section ci-dessous.

3.1 Méthodes de prélèvement des bioaérosols

3.1.1 Généralités

Les prélèvements des bioaérosols émis en entreprise sont réalisés pour documenter les niveaux d'exposition des salariés à différents polluants biologiques. Ces données permettent ensuite la caractérisation du danger biologique et de mettre en place le cas échéant des dispositifs de protection collective pour prévenir les effets décrits dans le paragraphe précédent. Ces mesures permettent également de vérifier le bon état de fonctionnement d'équipements déjà existants. Les bioaérosols et plus généralement les aérosols peuvent être prélevés avec différents appareils fonctionnant sur plusieurs principes physiques. Il n'existe aucun appareil qui permette de mesurer tous les composés aéroportés. C'est pourquoi le polluant étudié et notamment la fraction à laquelle il appartient conditionne le choix de l'appareil de prélèvement. Le matériel et les conditions de prélèvements ayant un effet sur les cellules, les dispositifs utilisés doivent permettre de collecter un échantillon représentatif de l'environnement et de conserver les propriétés biologiques nécessaires à l'analyse des particules (ex : capacité à cultiver des microorganismes). Ceci définit leur efficacité biologique. Ces appareils sont décrits par plusieurs caractéristiques comme par exemple : l'efficacité d'aspiration (l'efficacité avec laquelle les particules entrent dans l'appareil de prélèvement), l'efficacité d'échantillonnage (efficacité avec laquelle les particules atteignent la surface de collecte et y sont piégées) (Griffiths and DeCosemo 1994, Reponen *et al.*, 2011). D'après Hoisington *et al.* (2014), les bactéries seraient plus sensibles au choix du matériel de prélèvement que les moisissures

(Hoisington *et al.*, 2014). Pour la mesure des expositions aux bioaérosols, deux stratégies de prélèvement sont possibles : des prélèvements d'ambiance ou des prélèvements individuels. Pour les prélèvements individuels, l'appareil de prélèvement est porté par le salarié au niveau de la zone respiratoire du salarié. Lors d'un prélèvement d'ambiance (à point fixe), l'appareil de prélèvement est également placé à hauteur des voies respiratoires des salariés. Ce type de prélèvement permet de caractériser la contamination de l'air du poste.

Les appareils de prélèvements peuvent être classés en trois catégories selon le principe de collecte (impacteurs, impigners ou prélèvements par filtration).

3.1.2 Prélèvement par impaction

3.1.2.1 Impacteurs

Le principe de l'impaction repose sur la capacité d'une particule à dévier du flux d'air sous l'effet de son inertie lorsque le flux d'air rencontre ou contourne une surface solide (souvent du milieu gélosé) ou liquide. Les particules quittent le flux d'air pour venir s'impacter sur la surface de collecte. Les impacteurs sont constitués d'un étage (MAS 100) ou de plusieurs étages successifs (impacteur en cascade : Andersen) (figure 2). Dans les impacteurs en cascade, la taille des orifices à l'entrée d'un plateau diminue d'un étage à un autre ce qui crée une augmentation de la vitesse du flux d'air entre les étages. Les particules de masse plus importantes se déposent sur les étages supérieurs en raison de leur plus grande inertie (Crook 1995). Les impacteurs en cascade sont définis selon plusieurs paramètres : le rapport (sans dimension) de la distance entre le jet d'air et le support de collecte, le diamètre de la buse (S/V) et le débit d'échantillonnage. Chaque étage peut être défini par son diamètre de coupure ou d_{ae50} qui représente la taille de particule à laquelle 50% des particules sont collectées (Yao and Mainelis 2006). Les impacteurs mono-étages possèdent un débit important (100 L.min⁻¹ pour le MAS 100) et sont utilisés lors de prélèvements d'ambiance, de courtes durées, dans des environnements peu contaminés. Les impacteurs en cascade, les plus couramment utilisés, ont un débit moins important que les impacteurs mono-étages (28,3 L.min⁻¹ pour les impacteurs Andersen), le temps de prélèvement est en général court dans le secteur du tri des déchets (quelques minutes) (Park *et al.*, 2013 ; Tsai *et al.*, 2007 ; Yamamoto and Bibby 2014). Certains impacteurs en cascade comme les impacteurs Andersen ne peuvent être utilisés que pour des prélèvements d'ambiance en raison de la masse de ces appareils. D'autres, plus légers et plus petits, comme l'impacteur Marple, peuvent être utilisés pour des prélèvements d'ambiance ou des prélèvements individuels. Les impacteurs, mono-étage ou en cascade, peuvent accueillir plusieurs types de support de collecte : des boîtes de Pétri contenant des milieux gélosés (Andersen 6 étages), des filtres (Andersen 8 étages et Marple), des lames de verre (Burkhard). En fonction du support de collecte, plusieurs types d'analyses sont possibles. Avec un support gélosé, les microorganismes cultivables prélevés dans l'air peuvent être dénombrés. Les filtres permettent d'augmenter le nombre d'analyses possibles, avec du dénombrement de microorganismes cultivables mais également des analyses chimiques, biochimiques, moléculaires... Pour finir, les supports de collecte type « lame de verre » sont associés à une observation directe du prélèvement au microscope. Les supports gélosés sont ceux les plus souvent utilisés (Tsai *et al.*, 2007 ; Reboux *et al.*, 2009 ; Park *et al.*, 2013). Cependant, les bactéries voient leur capacité à être cultivées diminuer avec l'augmentation de la vitesse d'impaction et la distance avec la surface d'impaction. En général, les pollens et moisissures résistent mieux au stress généré par le prélèvement. Pour les bactéries, l'agrégation des cellules permettrait d'augmenter leur taux de survie (Reponen *et al.*, 2011).

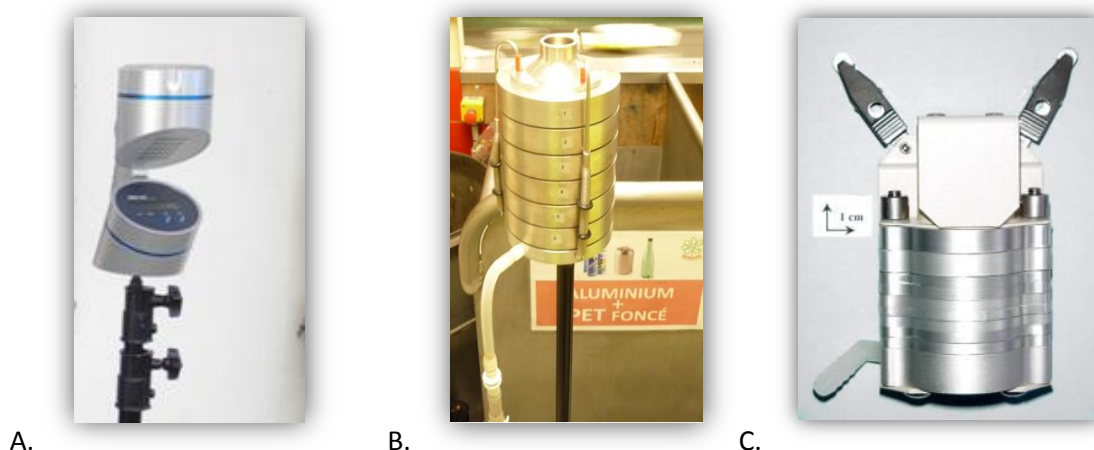


Figure 2 Exemples de trois impacteurs : **A.** impacteur monoétage : MAS 100, **B.** impacteur en cascade Andersen 6 étages (viable), **C.** impacteur en cascade Marple [Xavier Simon/Philippe Duquenne, INRS].

3.1.2.2 Impingers

Les «impingers» (impacteurs en voie liquide) fonctionnent sur le même principe que les impacteurs. La différence est que la collecte des particules se fait en milieu liquide : les particules sont d'abord impactées puis diffusées dans le liquide de collecte. Ceci a l'avantage de casser les agrégats de cellules et de faciliter les analyses biochimiques ou de biologie moléculaire en plus des méthodes utilisant la culture (Buttner *et al.*, 1996). En effet, si les impacteurs sont plus associés aux analyses par culture, les «impingers» le sont davantage pour les analyses de composés biologiques (Li 2011). Par ailleurs, la collecte en milieu liquide réduit le stress chez les bactéries sensibles, préservant leur capacité à être cultivées par rapport à une collecte sur milieu solide. Les limites de l'«impinger» résident surtout dans l'évaporation du liquide de collecte ou dans la ré-aérosolisation des particules collectées et fragilisées. Pour éviter les phénomènes d'évaporation du liquide de collecte, du glycérol peut être ajouté ou des liquides visqueux peuvent être utilisés (Reponen *et al.*, 2011). La figure 3 représente deux types d'«impinger». Le CIP 10 inhalable (Compteur Individuel de Particules) (figure 3 A.) prélève les particules de la fraction inhalable avec un débit de 10 L.min⁻¹. Les particules peuvent être collectées via deux types de support : sur une mousse pour le CIP 10-I classique ou dans le cas des bioaérosols, dans une coupelle pour le CIP 10-M (microbiologique). Le Biosampler® SKC (figure 3 B.) est un appareil en verre prélèvement les particules dans un liquide de collecte à un débit de 12,5 L.min⁻¹.

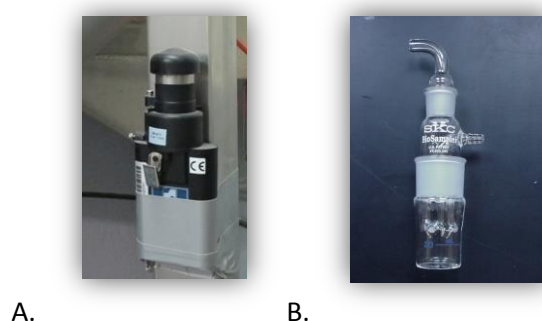


Figure 3 Exemple de deux « impingers », prélèvement en voie liquide : **A.** CIP 10 **B.** SKC Biosampler® [Xavier Simon/Philippe Duquenne, INRS].

3.1.3 Prélèvement sur filtre

Le principe de collecte par filtration des particules repose sur leurs propriétés physiques (taille, forme et densité), la taille des pores du filtre et la vitesse du flux d'air. La collecte des particules résulte des forces inertielles mais également des forces électrostatiques ou de la diffusion des particules. Les appareils de prélèvements par filtration sont les plus utilisés en raison de leur faible coût et leur facilité d'emploi. Ils peuvent servir pour une mesure de concentration en ambiance à point fixe ou à une mesure d'exposition individuelle. Le principal inconvénient de cette technique est la déshydratation des particules collectées entraînant une perte de capacité des bactéries à être cultivées ou une dénaturation des allergènes surtout en cas de prélèvement prolongé. Toutefois, cette méthode s'avère adaptée au prélèvement de spores, de moisissures et de pollens qui sont moins sensibles au stress. Elle est également adaptée pour des analyses biochimiques ou de biologie moléculaire (Buttner *et al.*, 1996 ; Crook and Sherwood-Higham 1997). La filtration nécessite l'élution des particules retenues sur le filtre. Il existe différents porteurs de filtres dont l'IOM, Button Inhalable Aerosol Sampler, la cassette de 25 ou 37 mm de diamètre (ouverte ou fermée). La cassette fermée est constituée de trois parties : une partie inférieure contenant le filtre approprié, une partie intermédiaire et une partie supérieure contenant un orifice de 4 mm de diamètre. Il existe également plusieurs catégories de filtre. Les filtres fibreux constitués de fibres de verre ou de cellulose dans lesquels les particules sont piégées en profondeur et en surface du filtre (réseaux fibreux). Ils sont surtout utilisés pour les analyses granulométriques. Ils sont peu utilisés pour le prélèvement des bioaérosols à cause de la difficulté à extraire les cellules du réseau fibreux. Les filtres membranaires sont constitués d'ester de cellulose, PVC, PTFE, nylon, gélatine... Les pores sont créés par évaporation d'un solvant à la surface de ces matières. Les particules peuvent être aussi bien retenues dans le filtre qu'à sa surface. Les filtres en gélatine ont l'avantage de diminuer la déshydratation des particules collectées par filtration mais ces filtres sont fragiles ce qui ne les rend pas appropriés pour des prélèvements prolongés (Crook 1995 ; Reponen *et al.*, 2011). Les filtres polycarbonates sont très utilisés pour le prélèvement des microorganismes aéroportés. Les particules sont collectées plus à la surface des filtres qu'en profondeur (Crook 1995).

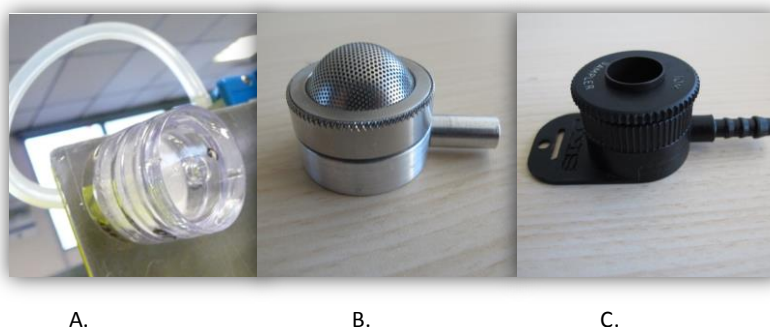


Figure 4 Exemples de matériel de prélèvement par filtration : **A.** cassette de 37 mm de diamètre, **B.** Button Sampler, **C.** IOM [Xavier Simon/Philippe Duquenne/Jodelle Degois, INRS].

3.2 Analyse quantitative des prélèvements de bioaérosols

En Europe, les mesures de microorganismes et des endotoxines en suspension dans l'air sont soumises à deux normes : EN 14031 et EN 13098 (AFNOR 2000, AFNOR 2003). Malgré cette normalisation, il n'existe pas de valeur limite d'exposition professionnelle aux bioaérosols ni de méthode d'analyse normalisée à l'échelle internationale. Les bioaérosols prélevés peuvent être caractérisés selon différents critères : la concentration des polluants totaux ou spécifiques, la

distribution granulométrique ou la composition. Les analyses des bioaérosols peuvent être donc qualitatives ou quantitatives. Il existe une grande variété de méthodes analytiques ; seules quelques méthodes quantitatives utilisées couramment seront décrites dans le paragraphe ci-dessous. Les méthodes qualitatives seront développées dans le paragraphe décrivant les méthodes d'analyse de la biodiversité microbiologique dans les bioaérosols.

3.2.1 Méthodes par mise en culture

La culture est la méthode préférentielle et historique pour l'analyse des microorganismes aéroportés. Les échantillons sontensemencés sur des milieux de culture, sélectifs ou non, à un pH, une température et pour une durée définis. Les champignons présents dans les bioaérosols sont généralement détectés après incubation à 25°C, à un pH acide et dénombrés pendant 5 jours consécutifs. Les résultats sont exprimés en UFC.m⁻³ d'air prélevé. Cette méthode est utilisée pour estimer la quantité de microorganismes viables et cultivables dans les échantillons prélevés avec des impacteurs, des impingers ou par filtration. L'impaction permet de prélever les échantillons directement sur les géloses qui sont ensuite incubées. Les particules collectées en milieu liquide sont étalées à la surface des géloses (suspension diluée ou non). Cette technique rapide et peu onéreuse permet d'avoir une bonne vue d'ensemble de la communauté bactérienne ou fongique de l'échantillon. Les méthodes par culture sont limitées par le choix du milieu de culture ainsi que le pH et la température d'incubation. Par ailleurs, beaucoup de microorganismes sont non cultivables et ne seront donc pas détectés via cette technique. La culture a donc une tendance à sous-estimer la charge microbienne et sa diversité. Cette sous-estimation peut également être due au stress du prélèvement, diminuant la capacité à cultiver de certains microorganismes, notamment les bactéries (Griffiths and DeCosemo 1994). Cette méthode est soumise à d'autres biais notamment à la différence de vitesse de développement des microorganismes et la production importante de spores (Kirk *et al.*, 2004 ; Fakruddin and Mannan 2013). Malgré ces limites, le dénombrement des microorganismes cultivables est la technique la plus utilisée pour évaluer l'exposition aux bactéries et moisissures dans les bioaérosols (Tsai *et al.*, 2007 ; Reboux *et al.*, 2009). Dans le secteur du traitement des déchets, cette technique est très utilisée. Elle a permis à Park et son équipe (2013) d'évaluer l'exposition aux bactéries Gram négatives et les moisissures lors de la collecte des déchets à Séoul (Park *et al.*, 2013).

3.2.2 Dosage des endotoxines et des (1,3)-β-D-glucanes par la méthode au LAL

Les endotoxines et les (1,3)-β-D-glucanes sont des composés couramment recherchés dans les bioaérosols (Adhikari *et al.*, 2011 ; Samadi *et al.* 2011). Les endotoxines sont des composés de la membrane externe des bactéries Gram-négatif. Elles sont constituées d'un lipide complexe, appelé lipide A, lié covalamment à un polysaccharide (AFNOR 2000). Les (1,3)-β-D-glucanes sont des polymères de D-glucose liés entre eux par des liaisons de type β. Ils peuvent être présents sous formes linéaire, ramifiée ou cyclique. Les ramifications sont majoritairement de type (1,3)-(1,4)-β-D-glucanes (présents chez les plantes comme l'avoine ou l'orge) ou (1,3)-(1,6)-β-D-glucanes (présents chez les levure et moisissures). Des (1,3)-(1,2)-β-D-glucanes sont également retrouvés (Laroche and Michaud 2007). La méthode au LAL (Limulus Amebocyte Lysate) permet de doser les endotoxines et les (1,3)-β-D-glucanes par deux voies d'activation différentes. Cette méthode est fondée sur la capacité naturelle du sang de limule à coaguler en présence d'endotoxines ou de (1,3)-β-D-glucanes. Les deux composés activent une voie différente, les endotoxines activent le facteur C alors que les (1,3)-β-D-glucanes activent le facteur G. Le dosage est une réaction enzymatique en cascade qui conduit soit à l'apparition d'un composé absorbant à 405 nm, soit à une augmentation de la

turbidimétrie (Dawson 1995). Les résultats du dosage s'expriment en unité d'endotoxine (UE).m⁻³ (AFNOR 2000) pour les endotoxines et en pg.m⁻³ pour les (1,3)- β -D-glucanes. Cette méthode de dosage est considérée comme la méthode de référence pour la mesure des endotoxines présentes dans les bioaérosols (Duquenne *et al.*, 2012).

3.2.3 Mesure par PCR en temps réel (qPCR)

Les concentrations en microorganismes aéroportés peuvent également être mesurées par qPCR qui permet de quantifier la charge totale en microorganismes totaux ou spécifiques (en fonction de la cible des amorces) dans les bioaérosols avec des résultats exprimés en nombre de copies de gènes.m⁻³ d'air prélevé. Le principe de cette technique est détaillé dans la figure 5. Dans les bioaérosols, cette technique a notamment été utilisée pour détecter et quantifier la présence de *Stachybotris chartarum* et d'*Aspergillus fumigatus* dans un centre d'incinération de déchets (Viegas *et al.*, 2014), dans un centre de tri des déchets (Malta-Vacas *et al.*, 2012). Cette technique est moins usitée pour l'évaluation des concentrations des microorganismes aéroportés que le dénombrement des microorganismes après culture.

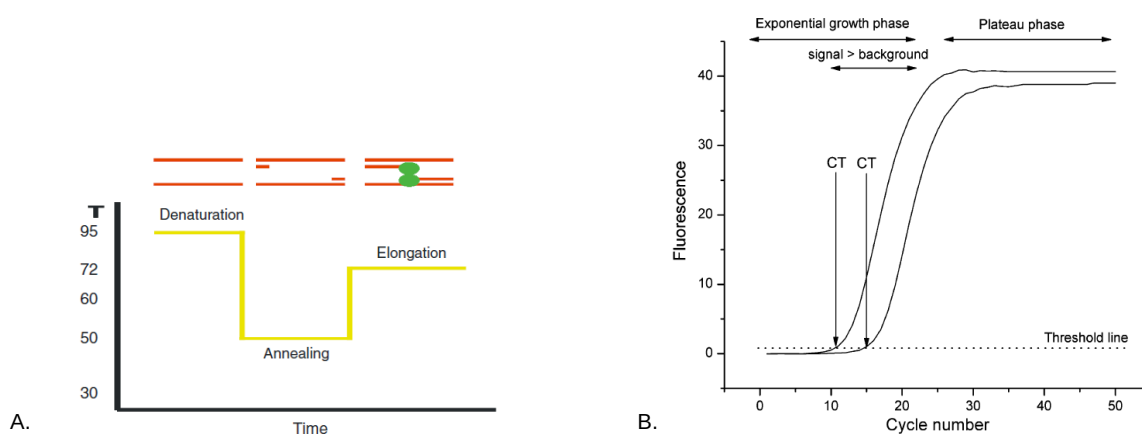


Figure 5 A. les différentes étapes d'un cycle de température de PCR, à 95°C se produit la dénaturation des deux brins d'ADN, les amorces viennent ensuite s'hybrider à l'ADN simple brin à une température spécifique à chaque amorce. L'élongation des brins d'ADN se produit à 70°C, température optimale de la réaction enzymatique. B. Courbe de réponse de la PCR en temps réel. Le C_T correspond au nombre minimum de cycles pour que le signal fluorescent se dissocie du bruit de fond. Figures issues de Kubista *et al.*, 2006.

3.2.4 Autres méthodes

Il existe d'autres méthodes d'analyse des bioaérosols. Les méthodes immunochimiques et notamment la méthode ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) permettent de détecter des antigènes grâce à la reconnaissance avec l'anticorps reconnaissant spécifiquement cet antigène. Les composants cellulaires comme l'ergostérol, les protéines... peuvent être caractérisés par des techniques physiques comme la chromatographie (HPLC, GC) ou la spectrométrie (spectrométrie de masse, spectrométrie infrarouge). La cytométrie en flux est une autre méthode physique utilisée dans la caractérisation de particules biologiques aéroportées. Les méthodes chimiques comme la fluorescence sont également utilisées. De nombreuses revues de la littérature décrivent en détails les méthodes d'analyses des bioaérosols de façon plus exhaustive (Martinez *et al.*, 2004 ; Reponen 2011 ; Liang *et al.*, 2012 ; Švabenska 2012 ; Méheust *et al.*, 2014).

4. La biodiversité

Comme il l'a été mentionné précédemment, il n'existe pas à ce jour de VLEP pour les bioaérosols. Ce manquement serait en partie dû à la grande complexité des bioaérosols en termes de taxons microbiens ou des composés biologiques les constituant. Les méthodes quantitatives globales dosent la totalité d'un groupe microbien (bactéries ou moisissures le plus souvent) sans discriminer les différents constituants. Or les effets sur la santé dépendent des espèces et des composés en présence. Pour pallier à cette limite, des techniques spécifiques, comme la culture en milieu sélectif, la PCR ou le dosage au LAL, sont employées pour détecter ou quantifier la présence de certains groupes microbiens ou de composés spécifiques (endotoxines ou (1,3)- β -D-glucanes). L'inconvénient de ces méthodes est qu'elles ne permettent pas une caractérisation globale de la composition des bioaérosols. Or la connaissance de la biodiversité des microorganismes aéroportés pourrait permettre de mieux caractériser le risque biologique pour mieux comprendre les effets sur la santé et peut être à plus long terme, déterminer des VLEP pour certains microorganismes ou composés.

4.1 La classification du vivant

La systématique est la science de la classification du vivant. Elle a pour objectif premier de répertorier tous les êtres vivants actuels et passés en les identifiant et en les décrivant. La classification permet également de comprendre la diversité du vivant. Elle est régie par des lois et la science qui étudie ces lois est appelée la taxinomie. Un taxon est un « ensemble d'organismes reconnus et définis dans chacune des catégories de la classification biologique ». Les différents groupes hiérarchisés encore utilisés à l'heure actuelle ont été définis par Carl von Linné au XVIII^{ème} siècle (figure 6). L'approche actuelle est basée sur la phylogénie qui a été introduite par Darwin qui proposait d'étudier la transmission d'un caractère aux générations suivantes plutôt que de classer en fonction des variations des caractères acquis. La systématique phylogénétique, quant à elle, a été fondée par Willi Henning au XX^{ème} siècle. Elle a pour objectif de reconstruire la phylogénie d'un taxon pour un caractère donné (état primitif versus état dérivé). Tous les membres du taxon possèdent l'état dérivé du caractère (Lecointre and Le Guyader 2006).

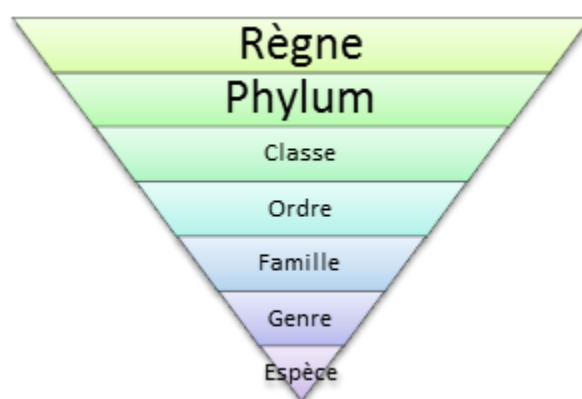


Figure 6 Catégories hiérarchisées du vivant définies par Carl von Linné

4.2 Définition de la biodiversité

La biodiversité ou diversité biologique a été définie dans l'article 2 de la Convention sur la Diversité Biologique (CDB) comme étant la « ... Variabilité des organismes vivants de toute origine y compris,

entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres systèmes aquatiques et les complexes écologiques dont ils font partie ; cela comprend la diversité au sein des espèces et entre espèces ainsi que celle des écosystèmes » (Nations Unies 1992). Les mesures de la diversité consistent à déterminer le nombre total d'espèces et leur répartition en terme d'abondance (Buttner et al. 1996).

4.3 Caractérisation de la biodiversité

Il existe plusieurs manières d'appréhender la biodiversité soit en caractérisant la composition au sein d'une localité précise (α diversité), soit comparer les communautés entre plusieurs habitats (β diversité) ou la composition au sein d'un habitat (diversité régionale) (figure 7).

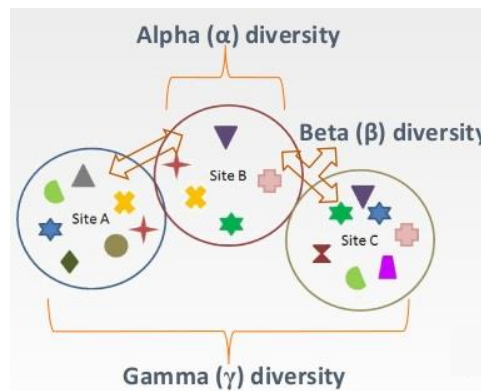


Figure 7 Représentation schématique des différents types de diversité. (image tirée de : <https://image.slidesharecdn.com/t10-burgess-firesub-tropicalwoodlands-150603053940-lva1-app6892/95/bushfireconf2015-10-managing-fire-for-nature-conservation-in-subtropical-woodlands-4-638.jpg?cb=1434967736>)

4.3.1 Calcul de l' α diversité

L' α diversité correspond à la biodiversité dans un lieu donné (figure 7). Elle s'évalue par le calcul de différents indices indiquant le nombre de taxons présents ou leur répartition dans l'échantillon. Les indices les plus souvent utilisés sont décrits ci-dessous.

- La richesse spécifique est le nombre de taxons dans la zone de l'étude. Elle dépend de la taille de l'échantillon. Pour s'affranchir de la taille de l'échantillon, plusieurs corrections sont possibles :

Margalef: $R1 = (S-1)/\log N$

Odum: $R2 = S/\log N$

Menhinick : $R3 = S/(\sqrt{N})$

Avec S = richesse spécifique et N = nombre d'individus

- L'indice de Simpson permet de calculer la probabilité que deux individus pris aléatoirement dans un milieu donné soit du même taxon. Il varie entre 0 (probabilité d'avoir deux taxons différents élevée) et 1 (probabilité d'avoir deux taxons différents faible). Il est donc proportionnellement inverse à la diversité. Il se calcule de la manière suivante : $\sum (N_i \times (N_i - 1)) / (N \times (N - 1))$.

- L'indice de Shannon est associé à l'indice de Simpson. Il permet d'exprimer la diversité en prenant en compte le nombre de taxons et l'abondance des individus au sein de chacun des taxons. Cet indice varie entre 0 [un seul taxon présent ou dominance d'un taxon] et $\ln(S)$ [égalité d'abondance entre les taxons] et se calcule grâce à la formule suivante : $H' = - \sum P_i \times \ln P_i$ où $P_i = N_i/N$,

N_i est le nombre d'OTUs appartenant à un même taxon et N est le nombre total d'OTUs

- Le Chao1 estime le nombre de taxons non observés à partir du nombre de taxons observés une ou deux fois. Il s'agit d'un estimateur minimum, valide à condition que les singletons et doubletons représentent une fraction importante de l'information.

Les indices de Shannon et Chao1 sont très sensibles à la taille des échantillons. L'indice de Simpson est moins sensible mais peut malgré tout être impacté. Plus la taille de l'échantillon sera importante, plus ces indices seront à même de décrire les taxons rares. Dans le cadre d'une analyse de métagénomique, il est par exemple important d'avoir un maximum de séquences de bonne qualité pour pouvoir décrire l' α diversité. Par ailleurs, pour comparer la diversité entre plusieurs échantillons, il faut homogénéiser la taille des bibliothèques générées par le séquençage (Gihring *et al.*, 2012). Différents logiciels dont le logiciel Mothur peuvent calculer les différents indices de l' α diversité (Schloss *et al.*, 2009).

4.3.2 Calcul de la β diversité

La β diversité correspond au taux de remplacement des taxons dans un gradient topographique, climatique ou d'habitat dans une zone géographique (figure 7). Elle est généralement déterminée en évaluant le nombre de nouveaux taxons apparaissant le long du gradient. L'évaluation de la β diversité est réalisée à l'aide d'une analyse multivariée. Elle a été définie pour la 1^{ère} fois en 1960 par Whittaker (Whittaker 1960) comme étant le rapport de la diversité γ sur la diversité α ($\beta = \gamma/\alpha$). Pour la calculer, il existe différents types d'analyse multivariée comme l'analyse des correspondances qui semble la plus indiquée pour déterminer des schémas de distribution des séquences selon les saisons, l'origine géographique, la structure de l'habitat et d'autres paramètres (Ramette 2007). Il existe également, comme pour la mesure de l' α diversité, différents indices peuvent caractériser la β diversité (Tuomisto 2010) :

- l'indice de similarité de Sorensen (QS), aussi appelé coefficient de Sorensen-Dice, qui mesure la distance de composition entre deux échantillons en se basant sur le nombre commun de taxons présents dans les deux échantillons : $QS = \frac{2|X \cap Y|}{|X| + |Y|}$ où X et Y représentent le nombre de taxons présents dans chaque échantillon ;
- L'indice de dissimilarité de Bray-Curtis (BC) qui mesure une différence de composition entre deux échantillons par l'équation : $BC_{XY} = 1 - QS$.

Ces deux indices sont complémentaires.

4.3.3 Calcul de la γ diversité

La γ diversité est apparentée à l' α diversité. Elle représente le nombre de nouveaux taxons apparus dans des échantillons prélevés dans un même habitat d'étendue géographique plus vaste que celle de l' α diversité (figure 7). Elle est communément appelée « diversité régionale ».

5. Méthodes d'analyse de la biodiversité microbiologique

Il existe de nombreuses revues dans la littérature qui décrivent les différentes techniques analytiques permettant d'étudier la biodiversité (Kirk *et al.*, 2004 ; Fakruddin and Mannan 2013 ; Douterelo *et al.*, 2014). L'analyse de la biodiversité dans des échantillons environnementaux et notamment dans les bioaérosols peut se faire par différentes méthodes utilisant la culture cellulaire, des techniques biochimiques ou des techniques moléculaires. Ces méthodes mettent en évidence les différences structurelles ou fonctionnelles entre les taxons présents dans l'échantillon. En pratique, il existe une multitude de méthodes permettant l'analyse de la biodiversité, seules quelques-unes régulièrement décrites dans les revues sont présentées. Le tableau 1 situé à la fin de cette section illustre les techniques d'analyse de la biodiversité qui ont été utilisées pour l'étude des bioaérosols. Ce tableau ne se veut pas exhaustif mais présente une variété de méthodes et de secteurs d'investigation appliqués aux mesures dans l'air.

5.1 Méthodes d'analyse culture-dépendantes : identification d'isolats

Si la culture est très utilisée pour évaluer les concentrations en microorganismes aéroportés, elle l'est également pour caractériser la biodiversité. Les échantillons de bioaérosols sont mis en culture sur des milieux adaptés, les colonies sont ensuite sélectionnées sur des critères morphologiques puis isolées et identifiées via différentes techniques dont certaines sont décrites dans les paragraphes ci-dessous.

5.1.1 Identification macroscopique et microscopique

L'identification des moisissures se fait sur des critères macroscopiques comme la vitesse de développement, les conditions de croissance (température, pH), la morphologie au *recto* et au *verso* de la boîte de Pétri, la couleur des colonies, mais également sur des critères microscopiques : observation du thalle et des spores. Cette méthode est très utilisée pour l'étude de la biodiversité fongique dans les bioaérosols, notamment dans le secteur du traitement des déchets. Dans ce même secteur, la diversité bactérienne est très peu renseignée. Il s'agit surtout de dénombrer les bactéries Gram négatif et les bactéries totales (tableau 2). Les principales limites de ces méthodes sont les mêmes que celles de toutes les méthodes culture-dépendantes : caractère non-cultivable de la plupart des microorganismes, phénomènes de compétition, milieux non optimaux pour la croissance. Il y a également de forte ressemblance morphologique entre différentes espèces microbiennes.

5.1.2 Identification des isolats par des tests biochimiques

Ces techniques permettent de caractériser des isolats microbiens en fonction de leur profil métabolique (capacité à utiliser différentes sources de carbone, production de gaz) grâce à différentes réactions chimiques. Elles permettent d'établir le profil métabolique d'une souche. Par exemples, des plaques de microtitration sont commercialisées par Biolog (Hayward, CA, USA, www.biolog.com), une pour les bactéries Gram négatives, une pour les bactéries Gram positives et une pour les champignons. Ces plaques permettent de tester 95 sources de carbone. Cette méthode est rapide, reproductible et permet de différencier des communautés microbiennes. Mais, elle ne permet que l'identification des microorganismes qui ont pu être cultivés. La méthode SCSU (sole carbon source utilization) est sensible à la densité de l'*inoculum* (Liu *et al.*, 2006, Fakruddin and Mannan 2013). Les tests biochimiques en galerie API ou Biolog ont permis la caractérisation de la

biodiversité dans les bioaérosols émis sur des plates-formes de compostage ou de la production d'œufs (Byeon *et al.*, 2008 ; Wang-Li *et al.*, 2012).

5.1.3 Identification par méthodes chimiques

Les chromatographies gazeuses et liquide-gaz sont utilisées pour identifier les microorganismes selon leurs composés structuraux ou leurs produits métaboliques (acides gras, en acides aminés, en glucides...). Le temps de rétention dans la colonne de chaque composé est déterminé puis comparé à une base de données pour pouvoir être identifié. Les chromatographies peuvent être couplées à de la spectrométrie de masse pour identifier les composés plus facilement. Ces méthodes sont très sensibles mais nécessitent un investissement de départ conséquent et sont dépendantes de bases de données (Hensel and Petzoldt 1995, Spurny 1995).

Deux techniques d'analyse des lipides membranaires utilisent le principe de la chromatographie : l'analyse des esters d'acides gras méthylés (FAME : fatty acid methyl ester analysis) et l'analyse des phospholipides (PLFA : phospholipid fatty acid). Les microorganismes ont une composition en acide gras C2 et C4 qui sont propres à chacun. Cette composition est stable, indépendante de la présence de plasmide, de mutations ou de dommages cellulaires. Les acides gras sont d'abord méthylés puis analysés par chromatographie en phase gazeuse. Cette méthode peut être appliquée directement sur les échantillons (de sol en général). Dans ce cas, les différents profils obtenus sont comparés par analyse multivariée. La méthode est quantitative, robuste, reproductible et peut être indépendante de la culture. Cependant, dans ce cadre, elle ne permet pas d'identifier une espèce en particulier mais plutôt de détecter des variations dans la composition des communautés (Fakruddin and Mannan 2013). La chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (MALDI-TOF) permet une identification des isolats microbiens par l'analyse du protéome. Ces techniques sont principalement utilisées pour étudier la biodiversité dans les sols. La spectrométrie de masse (MALDI-TOF) et les techniques d'analyse des lipides membranaires ont été utilisées pour caractériser les communautés bactériennes et fongiques dans des bioaérosols émis dans différents environnements professionnels (Rahkonen 1992, Byeon *et al.*, 2008 ; Madsen *et al.*, 2015 ; Madsen *et al.*, 2016).

5.1.4 Méthodes de biologie moléculaire

Les colonies microbiennes isolées peuvent également être identifiées par le biais de méthodes fondées sur l'examen de l'ADN. L'ADN est extrait d'une colonie isolée et amplifié par PCR en utilisant des amorces génériques universelles puis les amplicons sont purifiés (parfois clonés) et séquencés. Les séquences génétiques sont ensuite comparées aux séquences existantes dans les bases de données disponibles. Les principes des différentes méthodes employées sont détaillés dans la section suivante.

5.2 Méthodes d'analyse culture-indépendantes

Les méthodes de biologie moléculaire sont de plus en plus utilisées pour l'analyse des bioaérosols. Elles permettent de s'affranchir des limites de la culture et de collecter des données supplémentaires à celles déjà obtenues. Les échantillons de bioaérosols sont directement analysés après la récupération des particules collectées. Néanmoins, certains auteurs utilisent les méthodes de biologie moléculaire pour identifier certaines colonies après culture des échantillons. Les méthodes les plus utilisées dans les bioaérosols sont décrites dans les paragraphes ci-dessous.

5.2.1 Extraction d'ADN

Toutes les méthodes moléculaires d'analyse de la biodiversité sont dépendantes de la qualité de l'extraction d'ADN. La première étape de l'extraction est la lyse cellulaire par différentes voies selon la méthode choisie : voies mécanique (agitation en présence de billes de verre), thermique, enzymatique (lysozyme, chitinase) ou chimique (détergents : SDS). L'ADN est ensuite purifié, les autres composés (protéines, ARN...) sont éliminés pour ne pas interférer dans la réaction de polymérisation. L'étape de purification peut se faire notamment par élution de l'échantillon dans une colonne ne retenant que l'ADN. Il existe une grande multitude de méthode d'extraction de l'ADN dont des kits commerciaux ou des méthodes développées en laboratoire. Plusieurs études ont montré que l'extraction par agitation avec des billes de verre ou de silice était la méthode avec le meilleur rendement pour extraire l'ADN microbien (van Burik *et al.*, 1998 ; Claassen *et al.*, 2013). L'efficacité d'extraction de plusieurs kits commerciaux a été étudiée par plusieurs études (LaMontagne *et al.*, 2002 ; Whitehouse and Hottel 2007 ; Desneux and Pourcher 2014 ; Vishnivetskaya *et al.*, 2014). L'extraction d'ADN fongique apparait plus difficile en raison de la résistance de la paroi des spores fongiques aux différents traitements. Les méthodes d'extraction d'ADN fongique comportent une étape de lyse mécanique avec des billes suivie d'une étape de purification avec des solvants organiques ou simple centrifugation (Haugland *et al.*, 2002 ; Dean *et al.*, 2004). Ces méthodes ont démontré leur efficacité mais comportent l'inconvénient d'utiliser des solvants qui ont une toxicité importante pour l'expérimentateur tels que le phénol (toxique, corrosif et CMR) ou le chloroforme (cancérigène de catégorie 2, toxique de catégorie 4).

5.2.2 Marqueurs génétiques et analyse de la biodiversité

La métagénomique est une méthode qui a pour objectif l'étude du contenu génétique d'un échantillon environnemental pour caractériser la composition structurelle (biodiversité) ou fonctionnelle d'un habitat. Pour l'analyse de la biodiversité (composition structurelle de communautés microbiennes), l'analyse par métagénomique s'appuie sur des gènes marqueurs de certains groupes microbiens.

Marqueur fongique

Les séquences ITS (internal transcribed spacer) ont été sélectionnées parmi 4 régions (ITS, LSU, SSU et *rp1*) comme marqueurs fongiques (Schoch *et al.*, 2012). Les régions ITS1 et ITS2 sont séparées par le gène codant l'ARNr 5,8 S (figure 8A). Selon les espèces, la taille de cette région varie de 450 et 700 pb (Bellemain *et al.*, 2010). La variation inter spécifique quant à elle est en moyenne de 37%. La variation intra spécifique des régions ITS est de $2,51 \pm 4,57\%$ dans le règne des champignons, et plus précisément de $1,96 \pm 3,76\%$ chez les Ascomycètes et de $3,3 \pm 5,62\%$ chez les Basidiomycètes (Schoch *et al.*, 2012). En dépit de cette bonne résolution, la similarité des régions peut être trop importante entre des espèces différentes pour pouvoir les distinguer. Les variations entre les régions ITS1 et ITS2 sont corrélées ce qui suggère que les deux régions n'évoluent pas de manières indépendantes. La région ITS2 semblerait plus appropriée pour l'identification des taxons inférieurs (Nilsson *et al.*, 2008). La biodiversité fongique de l'air urbain a été étudiée par séquençage des ITS (Dannemiller *et al.*, 2014 ; Yamamoto and Bibby 2014). Le gène codant la petite sous-unité (SSU) ou ADNr 18S, qui est un marqueur de la biodiversité eucaryote (Bik *et al.*, 2012), a également été utilisé comme marqueur fongique pour des échantillons de bioaérosols émis dans une station d'épuration (Evans and Seviour 2012). Cependant, la petite-sous unité a été identifiée comme le marqueur génétique le moins performant (Schoch *et al.*, 2012) et à ce titre, l'utilisation de la région ITS est préférable pour les analyses de métagénomique fongique.

Biodiversité bactérienne

Le gène codant l'ARNr 16S est le marqueur historique de la biodiversité bactérienne caractérisée par des méthodes de biologie moléculaire (séquençage haut débit, méthodes dérivées de la PCR) (Deutschbauer *et al.*, 2006 ; Hospodsky *et al.*, 2012 ; Lin *et al.* ; 2014). De par son universalité et sa conservation, l'ADNr 16S est décrit comme une cible appropriée pour les études phylogénétiques (Woese 1987). Ce gène, qui mesure en moyenne 1550 pb, ne peut être séquencé entièrement en une seule réaction de séquençage. Cependant, la présence et l'analyse d'une ou plusieurs régions variables sur ce gène permettent d'obtenir une bonne résolution phylogénétique au niveau du genre (figure 8B) (Schloss and Westcott 2011). Les régions variables peuvent différer de plusieurs manières entre les espèces : une région variable peut être différente d'une espèce à une autre alors qu'une autre région variable peut être identique entre ces deux mêmes espèces (Di Bella *et al.*, 2013). L'ADNr 16S n'est pas le marqueur le plus robuste pour une identification au niveau de l'espèce. La biodiversité bactérienne a été caractérisée dans de l'air urbain et l'air d'un élevage de volaille par séquençage des gènes codant l'ARNr 16S (Nonnenmann *et al.*, 2010 ; Yamamoto and Bibby 2014).

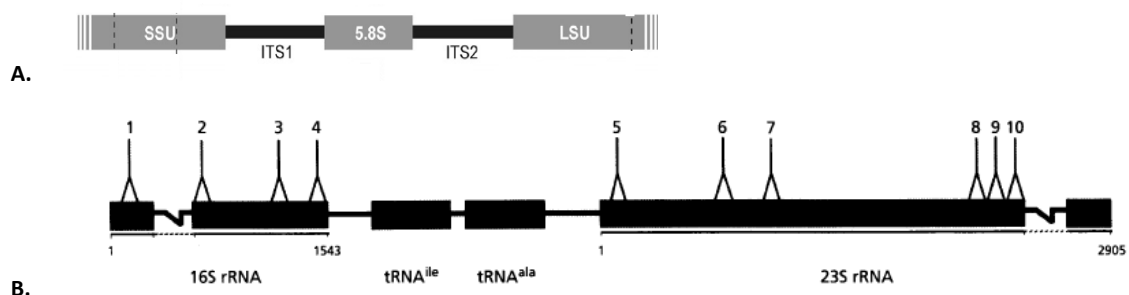


Figure 8 A. La région ITS est encadrée par la petite sous-unité ribosomique (SSU : 18S) et la grande sous-unité-ribosomique (LSU : 26S). Les régions ITS1 et ITS2 sont séparées par le 5.8S. Ces régions sont les marqueurs des eucaryotes, les ITS sont davantage des marqueurs fongiques. La figure est issue de Bellemain *et al.* (2101) **B.** Régions codant les ARN ribosomiaux, elles sont constituées de 10 régions variables. Les régions codant l'ARNr 16S sont souvent utilisées comme marqueur bactérien pour les analyses de biodiversité. Figure issue de Gurtler *et al.* (1996).

5.2.3 Etude et comparaison de communautés

Ces méthodes regroupent différentes techniques qui ont pour objectif d'identifier des différences de profils entre plusieurs communautés microbiennes. Ces techniques sont basées sur la séparation de séquences ADN par migration dans un gel par électrophorèse en conditions dénaturantes ou non. Elles constituent un ensemble de méthodes permettant de différencier des taxons ou de détecter des changements de structure dans une communauté mais pas pour décrire la biodiversité ou détecter un taxon spécifique (Liu *et al.*, 1997). Les bandes d'ADN peuvent être extraites du gel pour être ensuite séquencées et renseigner sur les taxons présents dans ces échantillons.

La SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) permet de séparer des séquences d'ADN simple brin de même taille en fonction de leur composition en nucléotides. La migration des fragments dans le gel dépend de leur structure secondaire. Elle peut mettre en évidence une mutation ou un nouveau polymorphisme entre différents échantillons. La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) et la TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) sont dérivées de la SSCP et reposent sur l'analyse de marqueurs phylogénétiques (ex : gène codant l'ARNr 16S) de l'ensemble d'une communauté. Pour se faire, l'ADN total d'un environnement est extrait et le marqueur d'intérêt est amplifié par PCR grâce à des amorces universelles contenant une région riche en GC ou CG clamp. Le pool de gènes amplifiés est différencié par migration sur un gel avec un

gradient de dénaturation (chimique pour la DGGE ou gradient de température pour la TGGE). En absence de clamp GC, l'ADN se dénature pour devenir simple brin. La distance de migration des fragments dépend de leur composition en nucléotides. Il est possible de comparer les différents profils de migration entre plusieurs échantillons et de voir leurs différentes compositions taxinomiques ou de suivre un même échantillon au cours du temps. Ces deux méthodes sont reproductibles, fiables, rapides et peu coûteuses. Elles permettent d'analyser un nombre important d'échantillons simultanément. Ces techniques ont quelques limites. Pour la SSCP, une séquence d'ADN peut adopter plusieurs conformations stables, la méthode est également limitée par les biais introduits par la PCR (Kirk *et al.*, 2004). Il a été estimé que seulement 1-2% des espèces majoritaires peuvent être identifiées avec la DGGE (MacNaughton *et al.*, 1999). La TGGE a été utilisée dans une étude caractérisant la biodiversité dans les aérosols d'une station de métro et de deux étables en France (Nieguitsila *et al.*, 2007). Toutefois, la TGGE et la DGGE sont surtout des méthodes utilisées pour caractériser des échantillons de sol ou d'eau (Kirk *et al.*, 2004 ; Douterelo *et al.*, 2014).

Les techniques de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) constituent d'autres techniques d'étude et de comparaison de communautés. Ces techniques se basent sur des différences de profils de restriction de l'ADN génomique ou de produits d'amplification PCR sur un gel non dénaturant. Les profils de migrations pouvant souvent être complexes et difficiles à interpréter, certaines techniques utilisent l'amplification et la digestion de marqueurs phylogénétiques tel que le gène codant l'ARNr 16S (ARDRA) ou des amorces marquées avec un fluorochrome (t-RFLP). Dans cette dernière technique, chaque fragment de même taille est considéré comme une OTU et la fréquence de chaque OTU peut être calculée.

Ces techniques sont limitées par l'extraction d'ADN, les biais de PCR, le choix des amorces universelles et la complexité des profils de migration. Par ailleurs, une digestion partielle des séquences peut amener à une sur-estimation de la diversité (Kirk *et al.*, 2004 ; Fakruddin and Mannan 2013). Néanmoins, ces techniques sont un bon moyen pour étudier les différences entre plusieurs échantillons (différences spatiale ou temporelle), détecter et surveiller les populations.

5.2.4 Métagénomique et séquençage de deuxième génération (NGS)

En 2005, le premier séquenceur de deuxième génération est commercialisé (technologie 454 commercialisée par Roche). L'avantage de ce type de séquençage repose sur l'automatisation des réactions qui réduit à la fois les coûts et les temps d'analyse mais également augmente le nombre de fragments d'ADN qui peuvent être séquencés en simultanée. Cette avancée technique a permis d'augmenter les connaissances sur la composition des communautés microbiennes dans des champs d'application variés. En effet, le séquençage à haut débit a permis d'améliorer la compréhension du microbiote humain (Human Microbiome Project, 2012) et plus particulièrement au niveau intestinal (Wylie *et al.*, 2012), de la cavité buccale (Chun *et al.*, 2010) ou du système urinaire (Dong *et al.*, 2011 ; Wolfe *et al.*, 2012). Il permet également le suivi de pathogènes (Reeves *et al.*, 2011; Grad *et al.*, 2012) ou la résistance aux antibiotiques (Toprak *et al.*, 2012). Les NGS ont également été utilisés pour caractériser des échantillons d'air (Hospodsky *et al.*, 2012 ; Kumari *et al.*, 2016), d'eau (Quaiser *et al.*, 2011 ; Somboonna *et al.*, 2012), de sol (Arfi *et al.*, 2012 ; Uroz *et al.*, 2013), pour étudier l'interaction champignons/plantes (Danielsen *et al.*, 2012) ou champignons/invertébrés (Sun *et al.*, 2011). Cette technologie a permis la détection d'un grand nombre de nouveaux microorganismes non cultivables. Il existe plusieurs types de plates-formes de séquençage haut débit dont deux ont été utilisées dans le cadre de cette thèse: technologie 454 (454 Life Sciences), système Illumina (Illumina/Solexa). Le principe de ces deux plates-formes est décrit dans les paragraphes ci-dessous.

5.2.4.1 Préparation des bibliothèques

Pour ces deux plates-formes, la première étape est la préparation de bibliothèques de séquences qui a pour objectif d'amplifier l'ADN à séquencer. L'amplification peut être faite en émulsion (454 technologies) ou par PCR par pontage (Illumina) (figure 9). Les premières étapes sont communes aux deux méthodes. L'ADN est fragmenté puis fixé à des adaptateurs spécifiques selon la technologie puis les brins sont ensuite dénaturés. Pour la PCR en émulsion, les adaptateurs sont hybridés à des billes (de 25 μm de diamètre). Les billes sont réparties dans des vésicules eau/huile, l'amplification des fragments et la génération de la bibliothèque se produit dans une émulsion. Après l'amplification, l'émulsion est cassée et les billes sont réparties dans des puits où elles sont fixées avant la réaction permettant le séquençage des fragments amplifiés. Les vésicules sont dénaturées pour récupérer les billes et éliminer les séquences qui ne seraient pas hybridées (Shendure and Ji 2008). Pour la plate-forme Illumina, l'amplification des fragments se fait par hybridation des adaptateurs sur une plaque (figure 9B.). L'amplification par « bridge PCR » permet de regrouper les fragments en clusters.

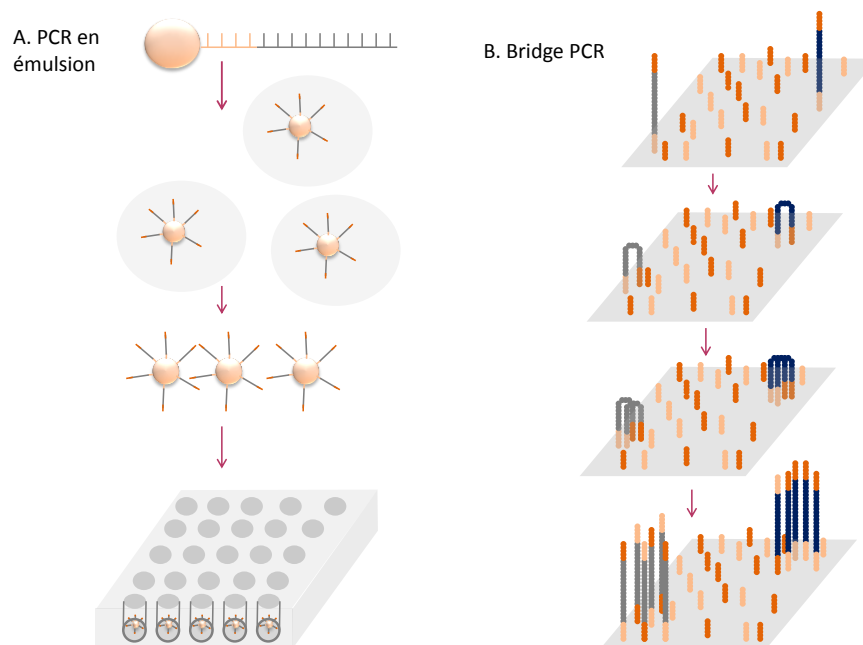


Figure 9 Préparation des bibliothèques. **A.** pour les plates-formes technologies 454. Les fragments d'ADN sont hybridés sur des billes qui sont ensuite réparties dans des vésicules d'émulsion eau/huile où la réaction d'amplification se produit. A la fin de cette réaction, les vésicules sont dénaturées, les séquences non hybridées sur les billes sont éliminées par l'ajout d'agent dénaturant. **B.** pour la plate-forme Illumina, les adaptateurs sont fixés sur une plaque, à la fin de l'amplification, les fragments sont regroupés en clusters.

5.2.4.2 Principes de séquençage des différentes plates-formes

Technologie 454

La technologie 454, ou pyroséquençage, est la première méthode commercialisée. Elle repose sur le dosage du pyrophosphate émis lors de la réaction de polymérisation (Nyren *et al.*, 1993). A chaque ajout de dNTP dans le brin d'ADN, le pyrophosphate émis va réagir avec de l'APS pour former de l'ATP. Cet ATP sera utilisé dans la réaction de la luciférase transformant la luciférine en oxyluciférine libérant un photon (figure 10). Entre chaque ajout de base, un lavage est effectué pour éliminer les bases non appariées et les produits formés lors de la réaction. Le signal lumineux est proportionnel au nombre de bases incorporées. Cependant, une des sources de biais du pyroséquençage est la

mauvaise détection des homopolymères. Cette technique permet de séquencer des fragments de 700 pb. La technologie 454 a été utilisée pour caractériser la biodiversité dans l'air de différents environnements : l'air d'une salle de classe (Hospodsky *et al.*, 2012), des élevages de volailles (Nonnenmann *et al.*, 2010), l'air atmosphérique urbain (Yamamoto *et al.* 2012 ; Dannemiller *et al.*, 2014). La société Roche ne commercialisant plus les réactifs nécessaires au séquençage par la technologie 454, ce type de séquençage ne peut plus être utilisé.

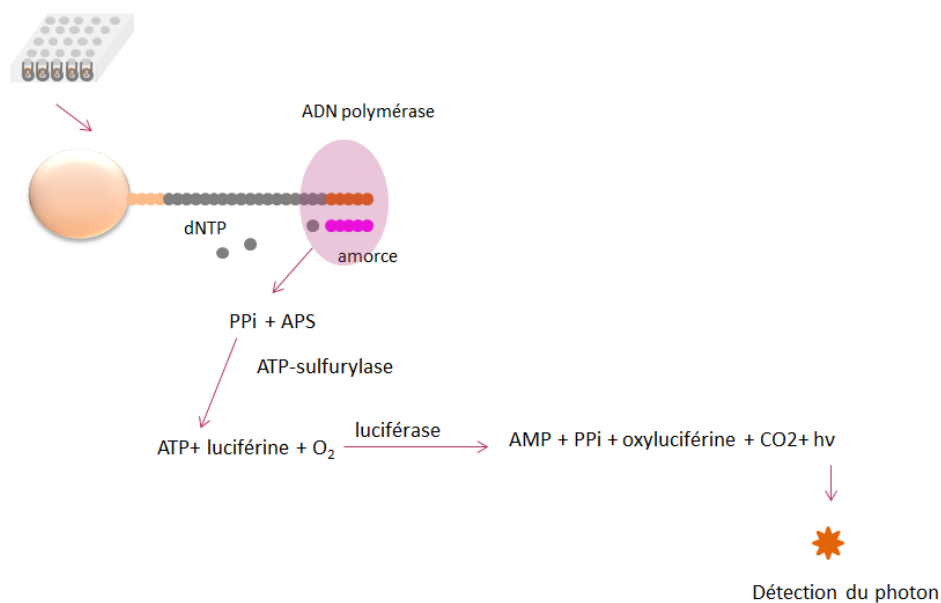


Figure 10 Principe du pyroséquençage par la technologie 454.

Technologie Illumina

Cette technologie a été mise sur le marché en 2006 par la société Solexa (Voelkerding *et al.*, 2009). Le principe du séquençage repose sur l'ajout de dNTPs marqués par des fluorochromes bloquant la polymérisation. Après incorporation du dNTP marqué, un lavage permet d'éliminer les autres dNTPs. Suite à cette étape, le fluorochrome est clivé puis détecté et un nouveau cycle commence (figure 11). Un des principaux inconvénients de cette méthode est la courte lecture de séquence (150 pb pour la plateforme HiSeq et 250 pb pour la plateforme Miseq) ne permettant pas une bonne résolution au niveau de l'espèce. Les substitutions sont les principales sources d'erreurs de séquençage.

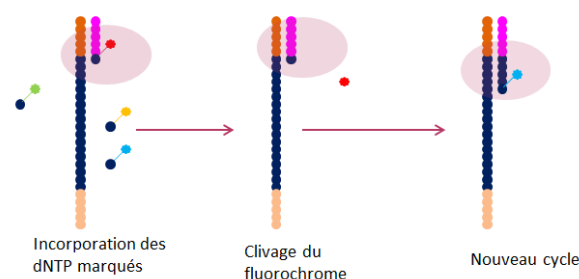


Figure 11 Principe du séquençage par la technologie Illumina.

5.2.4.3 Analyse des résultats de séquençage nouvelle génération

Après séquençage, les séquences brutes sont prétraitées pour éliminer les amorces et les séquences de mauvaise qualité ou contenant des erreurs de séquençage. Cette étape peut être intrinsèque à la plateforme de séquençage ou réalisée avec un logiciel tels Mothur (Schloss *et al.*, 2009) ou QIME (Caporaso *et al.*, 2010). La bonne qualité des séquences conditionne la qualité des résultats de séquençage. Pour alléger le traitement des données, les séquences ayant un pourcentage de similarité prédéfini sont regroupées en OTUs (operational taxonomic unit). En règle générale, le pourcentage de similarité dans une OTU est fixé à 97 % prenant en compte les erreurs de séquençage et permettant de réduire le jeu de données. Ce pourcentage semble être bien adapté pour l'identification des régions ITS fongiques (Nilsson *et al.*, 2008). Les OTUs seront assignées, après alignement, par comparaison avec des séquences de référence présentes dans des bases de données. Pour les séquences bactériennes, les bases de données les plus utilisées sont SILVA, RBP (ribosomal data project), Greengenes, GenBank (base de données de NCBI). Les bases AFTOL (assembling the fungal tree of life) et UNITE sont des bases de données spécifiques pour les séquences ITS. La plupart des séquences présentes dans les bases de données spécifiques aux ITS peuvent être retrouvées dans la base de données GenBank (Porter and Brian Golding 2011). L'étape d'identification des OTUs peut se faire en utilisant différents algorithmes. Parmi les plus utilisés, il y a l'algorithme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ; qui utilise une matrice de similarité pour calculer des scores d'alignements (E-value) entre la séquence d'intérêt et les séquences de la base de données ; MEGAN (algorithme du plus petit ancêtre commun : phylogénétique) ou d'autres algorithmes utilisés dans les logiciels de traitements de séquences (Mothur, QIME). Il semblerait que BLAST soit plus indiqué pour l'analyse de données issues du séquençage haut débit, MEGAN étant plus approprié pour les petits jeux de données. Par ailleurs, MEGAN serait plus fiable pour l'analyse de séquences de petites tailles (<400 pb) tandis que BLAST aurait la meilleure couverture pour tous les rangs taxonomiques (Porter and Brian Golding 2011). Il existe donc un grand nombre d'outils permettant le traitement des données issues du séquençage, du nettoyage des séquences à l'assignation des OTUs.

5.2.5 Synthèse des méthodes utilisées pour étudier la biodiversité dans les bioaérosols

Le tableau 1 présenté ci-dessous est une synthèse des méthodes employées pour l'étude de la biodiversité dans les bioaérosols. Ce tableau ne se veut pas exhaustif mais a pour objectif de montrer la variété de techniques d'analyse utilisées ainsi que les différents secteurs investigués. La biodiversité dans les bioaérosols est principalement étudiée par des techniques d'identification d'isolat après une mise en culture y compris pour des études récentes. La métagénomique est moins utilisée pour l'analyse des communautés microbiennes dans les bioaérosols émis notamment en milieu professionnel. Aucune étude permettant la caractérisation de la biodiversité microbienne aéroportée en centre de tri par séquençage à haut débit n'a été rapportée.

Table 1 Mesure de la biodiversité microbienne dans les bioaérosols via différentes méthodes d'identification

Pays	Environnement	Bioaérosols	Méthode	Référence
Portugal	Tri et incinération des déchets ménagers	Champignons	Culture suivi par identification macro et microscopique	(Viegas <i>et al.</i> , 2014)
Finlande	Traitement des déchets	Champignons	Culture suivi par identification macro et microscopique	(Tolvanen 2001)
Finlande	Traitement des déchets	Champignons	Culture suivi par identification macro et microscopique	(Lehtinen <i>et al.</i> , 2013)
Inde	Air urbain	Bactéries et champignons	Culture suivi d'une identification macro et microscopique	(Raghav <i>et al.</i> , 2015)
Portugal	Air intérieur : habitations, garderie d'enfants, écoles, centres de soin pour personnes âgées	Champignons	Culture suivi d'une identification macro et microscopique	(Madureira <i>et al.</i> , 2015)
France	Etable, station de métro, poulaillers	Champignons	Culture suivi d'identification	(Nieguitsila <i>et al.</i> , 2007)
Portugal	Recyclage des déchets	Champignons	Culture suivi par identification macro et microscopique Détection d' <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> et <i>Stachybotris chartarum</i> par PCR	(Malta-Vacas <i>et al.</i> , 2012)
Danemark	Recyclage du papier	Champignons	Culture suivi par identification microscopique	(Breum <i>et al.</i> , 1999)
USA	Ecoles	Champignons	Méthodes cultures-dépendantes	(Cooley <i>et al.</i> , 1998)
USA	Bureaux	Champignons	Culture suivi d'identification des colonies	(Tsai <i>et al.</i> , 2007)
Australie	Air urbain	Champignons	Culture suivi d'une identification microscopique	(Irga and Torpy 2015)
Pologne	Centre d'enfouissement des déchets	Champignons	Culture suivi par une identification des colonies	(Breza-Boruta 2012)
France	Air intérieur, habitations	Champignons	Culture suivi d'une identification macro et microscopique	(Reboux <i>et al.</i> , 2009)
Belgique	Air intérieur, habitations	Champignons	Culture suivi par une identification des colonies	(Beguín and Nolard 1994)
France	Air intérieur, habitations	Champignons	Culture suivi d'une identification macro et microscopique	(Dallongeville <i>et al.</i> , 2015)
Danemark	Production de semences végétales	Bactéries et champignons	Culture suivi de spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS)	(Madsen <i>et al.</i> , 2015)
Danemark	Collecte des déchets	Bactéries et champignons	Culture suivi de spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS)	(Madsen <i>et al.</i> , 2016)
Suisse	Production de lait	Bactéries	Culture suivi de spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS)	(Brandl <i>et al.</i> , 2014)
Norvège	Stations de métro	Bactéries	Culture suivi de spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS)	(Dybwad <i>et al.</i> , 2014)

Partie 1: contexte bibliographique

Danemark	Collecte des déchets ménagers	Bactéries et champignons	Culture suivi d'une identification microscopique (champignons) ou par tests biochimiques (API) pour les bactéries	(Nielsen <i>et al.</i> , 1995)
Portugal	Tri du verre	Bactéries et champignons	Culture suivi d'une identification microscopique (champignons) ou par tests biochimiques (API) pour les bactéries	(Pinto <i>et al.</i> , 2015)
Chine	Milieus hospitaliers	Bactéries	Culture suivi d'une identification macro et microscopique, tests biochimiques (API et VITEK)	(Yu <i>et al.</i> , 2015)
Finlande	Centre de traitement des déchets	Bactéries	Culture suivi d'une identification macro et microscopique, analyses chimiques (FAME)	(Rahkonen 1992)
Corée du sud	Centre de compostage	Champignons et Actinomycètes	Culture suivi d'une identification macro et microscopique, tests biochimiques (Biolog et API) et analyses chimiques (FAME)	(Byeon <i>et al.</i> , 2008)
USA	Production d'œufs	Bactéries	Culture suivi d'une identification macro et microscopique, tests biochimiques (Biolog)	(Wang-Li <i>et al.</i> , 2012)
Jordanie	Air urbain	Bactéries et champignons	Champignons : Culture suivi d'une identification microscopique Bactéries : Culture suivi de tests biochimiques (RapID CB® plus system), séquençage (méthode non précisée)	(Jacob <i>et al.</i> , 2016)
Pologne	Centre d'enfouissement des déchets	Bactéries et champignons	Culture suivi de tests biochimiques (API) (bactéries), identification macro et microscopique (champignons), génotypage par PCR MP	(Frączek and Kozdrój 2016)
France	Air intérieur : archives du film français	Champignons	Culture suivi de séquençage (méthode non précisée)	(Rakotonirainy <i>et al.</i> , 2016)
Chine	Traitement des eaux	Bactéries et champignons	Champignons: culture suivi d'identification Séquençage clones bactériens (ABI 3730DXL DNA Sequencer)	(Guo <i>et al.</i> , 2014)
Norvège	Air extérieur	Bactéries	Séquençage de clones par « chain-termination method »	(Fahlgren <i>et al.</i> , 2010)
France	Etable, station de métro, poulaillers	Champignons	TTGE	(Nieguitsila <i>et al.</i> , 2007)
Canada	Elevage de volailles	Bactéries	DGGE	(Just <i>et al.</i> , 2011)
Chine	Air extérieur, air intérieur : bureau, hôtel	Bactéries	DGGE	(Shen <i>et al.</i> , 2013)
Danemark	Porcherie	Bactéries et champignons	Fluorescence in situ hybridization	(Kristiansen <i>et al.</i> , 2012)
Allemagne	Toit (extérieur) sur un campus	Champignons	Séquençage (ABI Prism 377 (Applied Biosystem)	(Fröhlich-Nowoisky <i>et al.</i> , 2009)
Israël	Toit d'un immeuble	Champignons	Séquençage (GS FLX Titanium Platform)	(Dannemiller <i>et al.</i> , 2014)

Partie 1: contexte bibliographique

USA	Salle de classe	Bactéries	Séquençage (454 GS-FLX multiplex identifiers)	(Hospodsky <i>et al.</i> , 2012)
USA	Air urbain	Champignons	Séquençage (454 FLX Titanium)	(Yamamoto <i>et al.</i> , 2012)
USA	Elevage de volaille	Bactéries et champignons	Séquençage (454 FLX Titanium)	(Nonnenmann <i>et al.</i> , 2010)
Chine	Mine de charbon	Bactéries et Archebactéries	Séquençage (454 FLX Titanium)	(Guo <i>et al.</i> 2015)
Corée du sud	Porcherie	Bactéries	Séquençage 454 FLX Titanium	(Kumari and Choi 2015)
Danemark	Production de semences végétales	Bactéries et champignons	Séquençage (Illumina)	(Madsen <i>et al.</i> , 2015)
Chine	Mine de charbon	Bactéries et champignons	Séquençage (454 FLX Titanium)	(Wei <i>et al.</i> , 2015)
Suisse	Production de lait	Bactéries	Séquençage (Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit)	(Brandl <i>et al.</i> , 2014)
Corée du sud	Porcherie	Champignons	Séquençage (Illumina HiSeq sequencing)	(Kumari <i>et al.</i> , 2016)
Corée du sud	Air extérieur	Champignons	Séquençage (Illumina MiSeq)	(Lee <i>et al.</i> , 2016)
USA	Air intérieur : habitation	Bactéries	Séquençage (Roche GS FLX)	(Miletto and Lindow 2015)
Hongrie	Compostage	Champignons	Séquençage (ABI 310 Genetic Analyzer)	(Sebők <i>et al.</i> , 2015)

6. Exposition professionnelle aux bioaérosols dans le secteur du traitement des déchets

Des expositions aux bioaérosols ont été recensées dans divers secteurs d'activité tels que l'agroalimentaire, les élevages, le traitement des eaux usées et le traitement des déchets. La présente étude s'est focalisée sur ce dernier domaine d'activité.

6.1 Secteur du traitement des déchets

En France, un déchet est défini comme étant « tout résidu d'un processus de production, de transformation ou d'utilisation, toute substance, matériau, produit abandonné ou que son détenteur destine à l'abandon » par l'article L-541-1 du Code de l'environnement. Les produits qui sont directement réutilisés sur leurs lieux de production ne sont pas considérés comme déchet. En 2012, la France a produit 345 millions de tonnes de déchets dont 30 millions pour les ménages. Les déchets ménagers et assimilés (déchets non dangereux provenant des entreprises) sont collectés par les services municipaux puis traités dans différentes infrastructures. Au dernier recensement (2014), le parc d'installations dédiées au traitement des déchets non dangereux comptait : 410 centres de tri, 626 centres de compostage, 228 centres de stockage, 126 centres d'incinération dont 115 sont équipés pour la valorisation énergétique, 12 centres de méthanisation et 43 centres de tri mécano-biologique. L'élimination des déchets par des filières de valorisation matière et énergétique est favorisée avec environ 11 millions de tonnes de déchets non dangereux traités en centre de tri. Cette tendance est dictée par l'Union Européenne qui projette de recycler 50% des déchets ménagers d'ici 2020. Ceci explique la constante augmentation du nombre de centres de tri avec une progression de 265 à 410 installations entre 2000 et 2014 (ADEME 2017).

6.2 Organisation d'un centre de tri

Les centres de tri sont classés selon trois typologies par le rapport établi par l'ADEME en 2012 (ADEME and FNADE 2012). Le type « pelle à grappin » est très peu mécanisé, le tri des déchets s'effectue au sol avec une pelle et un grappin. Les centres de type « chaîne manuelle » ont un niveau d'automatisation intermédiaire, ils doivent posséder au moins une chaîne de tri mécanisée et/ou une cabine de tri manuel. Le troisième type est dit « chaîne automatisée ». Malgré les différences de typologie entre les installations, les centres de tri ont le même plan de fonctionnement général (figure 12). Les déchets sont acheminés dans une plateforme de réception, où les camions sont pesés sur un pont à bascule. La qualité des déchets est vérifiée visuellement dans les camions suivie d'un contrôle plus approfondi pour éviter l'acheminement de déchets non admis (déchets dangereux). Les déchets sont ensuite déchargés et entreposés, le plus souvent au sol. Un pré-tri mécanique et manuel est ensuite effectué pour éliminer les déchets qui ne sont pas valorisables ou qui pourraient perturber la chaîne de tri (sachets plastiques). Le tri manuel est généralement réalisé en cabine, les déchets sont acheminés sur des tapis roulant, l'opérateur répartit les déchets dans différentes alvéoles situées en contrebas. Les cabines de tri et de pré-tri sont isolées, en hauteur, du reste de la chaîne par une enceinte fermée pour limiter les nuisances sonores et le risque de choc avec les engins au sol. Le tri peut également être mécanique (cribles) pour séparer les déchets en fonction de leur forme, de leur taille ou de leur nature. Il peut être complété par un tri plus automatisé qui utilise des séparateurs magnétiques ou des appareils de tri optique. Les déchets sont ensuite conditionnés

pour être expédiés vers d'autres installations. Quatre types d'emploi sont identifiés dans les centres de tri : les salariés travaillant comme opérateur trieur (avec une activité de contrôle de la qualité des produits triés), les caristes qui alimentent les trémies, vident les alvéoles et chargent les balles des matériaux triés dans les camions, le personnel de maintenance et le personnel d'encadrement/administratif. En 2012, le nombre de salariés dans les centres de tri est estimé à 7000 personnes (Cabaret and Follet 2013).

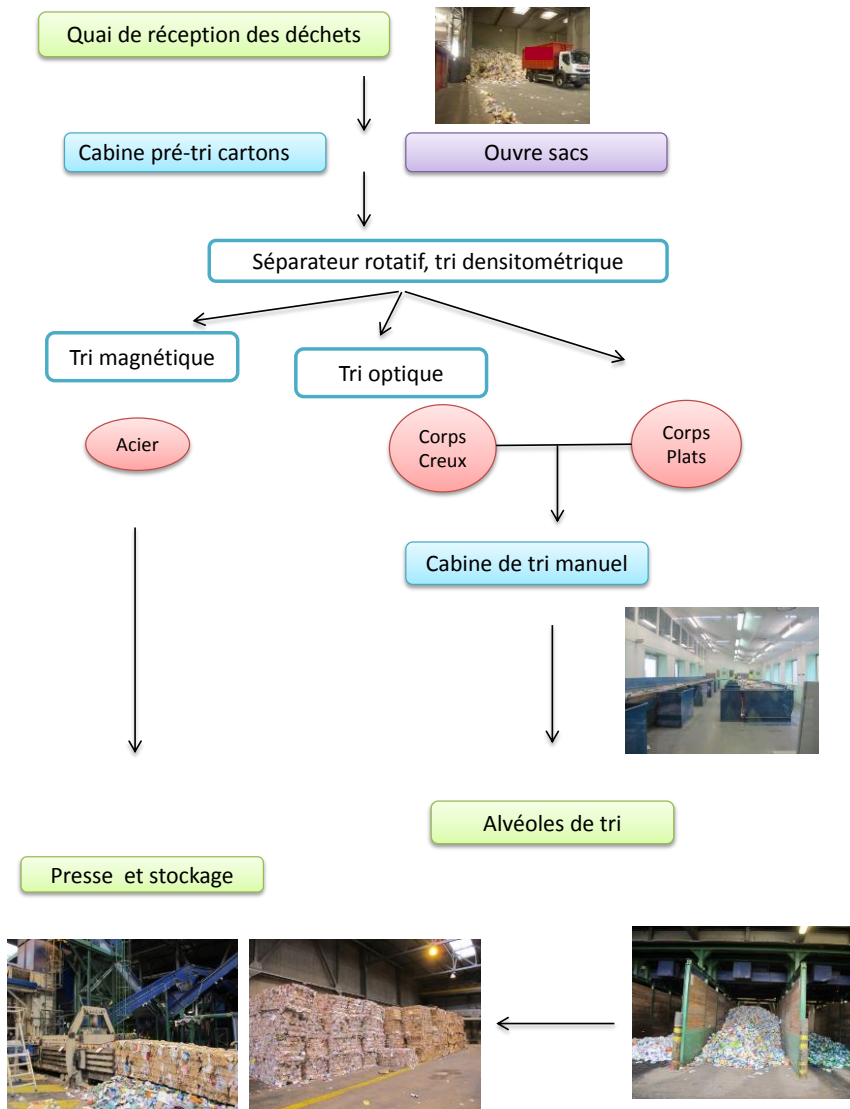


Figure 12 Organisation générale d'un centre de tri des déchets. Les étapes en vert sont réalisées au sol avec parfois l'intervention de véhicules, les étapes en bleu plein sont manuelles et exécutées en hauteur. Les étapes de tri cerclées bleues sont automatisées et en hauteur. Pour finir, l'étape en violet peut être manuelle ou automatisée en fonction des centres de tri. En règle générale, les étapes manuelles sont exécutées sur des plates-formes en hauteur pour être isolées des véhicules au sol.

6.3 Exposition aux bioaérosols dans le secteur de traitement des déchets

Le secteur du traitement des déchets est une source d'émission de bioaérosols (tableau 2). La plupart des mesures sont réalisées en ambiance, il y a peu de données d'exposition des salariés aux bioaérosols dans ce secteur. Les mesures d'ambiance montrent la présence de champignons, de

moisissures et parfois d'endotoxines dans ces bioaérosols. Il semblerait que les concentrations en moisissures mesurées dans l'air varient en fonction de l'activité associée au déchet : $4,3.10^4 \pm 1,4.10^4$ UFC.m⁻³ dans un centre de tri ; $3,7.10^3 \pm 9,7.10^2$ UFC.m⁻³ pour la collecte des déchets (Park *et al.*, 2013). La comparaison des résultats entre les études est difficile à cause du manque de standardisation de l'analyse des données et de l'expression des résultats. Les résultats sont exprimés par des moyennes (géométriques et/ou arithmétiques), des médianes et même le nombre total de colonies dénombrées dans les cultures. Le minimum et le maximum des valeurs mesurées ainsi que l'écart-type viennent dans certains articles compléter les valeurs pour en améliorer l'interprétation (Park *et al.*, 2013). A la variabilité de l'analyse des résultats vient s'ajouter des différences dans la stratégie de prélèvement : appareil et durée de prélèvement, type de filtre, débit des pompes... Cette hétérogénéité ne permet pas de déterminer si les variations de concentrations en microorganismes entre les études sont réelles ou si elles sont dues à des différences d'échantillonnage et d'analyse. La biodiversité fongique ou bactérienne est peu étudiée. Elle est souvent caractérisée par des méthodes culture-dépendantes comme l'identification macroscopique et microscopique. Les genres majoritaires qui sont observés dépendent de l'étude. Ainsi, *Aspergillus* est le genre dominant dans un centre de tri au Portugal (Viegas *et al.*, 2014), tandis que *Penicillium* l'est au Danemark (Breum *et al.*, 1999). D'autres études recherchent une ou plusieurs espèces spécifiques en utilisant une détection par PCR (Malta-Vacas *et al.*, 2012 ; Viegas *et al.*, 2014). Les analyses par identification après culture et PCR sont sélectives et si elles apportent des informations essentielles, elles ne permettent pas une caractérisation globale de la biodiversité fongique ou bactérienne. Les prélèvements sont le plus souvent réalisés ponctuellement, à un instant donné. Les variations de concentration ou de composition des bioaérosols ainsi que les paramètres pouvant influencer sur ces données ne sont pas étudiés. En Corée du sud, Park et son équipe ont étudié les déterminants de la concentration fongique dans le secteur du tri des déchets (Park *et al.*, 2013). Ils ont analysé différents paramètres tels que le type d'activité, les conditions météorologiques avant et pendant le prélèvement, le type de gestion du centre, la nature du déchet... Hors il semblerait que la nature des déchets ainsi que leur temps de stockage ont une influence sur les concentrations en microorganismes cultivables (Schlosser *et al.*, 2015 ; Gladding and Gwyther 2017). Mais la biodiversité, selon ces déterminants, n'est pas renseignée. Les connaissances sur la composition des bioaérosols émis dans les centres de tri et recyclage des déchets sont partielles. Pourtant, les effets néfastes sur la santé des salariés sont manifestes et plusieurs revues scientifiques sur le sujet demandent une meilleure connaissance des bioaérosols dans le secteur du traitement des déchets (Poulsen *et al.*, 1995 ; Tolvanen 2004 ; Giusti 2009). Dans ce contexte, une caractérisation approfondie de la biodiversité fongique et bactérienne, ainsi que l'étude de ses déterminants, dans le secteur de recyclage et tri des déchets sont pertinentes et nécessaires. L'objectif sera d'augmenter les connaissances sur la composition des bioaérosols dans ce secteur d'activité pour ensuite améliorer les connaissances sur les expositions des salariés.

Table 2 Mesures des particules biologiques dans le secteur du traitement des déchets avec deux stratégies de prélèvement : prélèvements d'ambiance (A) et prélèvements individuels (I). Les concentrations correspondent à des moyennes (moy), à des médianes (Med) ou à un nombre total de colonies dénombrées (nb UFC).

Pays	Type d'activité	Bioaérosols	Biodiversité	Résultats	Références
Portugal	Centre de recyclage des déchets (A)	Champignons	Identifications sur critères macro et microscopiques	7508 UFC.m ⁻³ (nb UCF) Genre <i>Aspergillus</i> majoritaire (<i>A. Niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i>)	(Viegas et al., 2014)
Finlande	Centre de tri optique des sacs de déchets verts (A)	Champignons, bactéries et endotoxines	Identification microscopique	Champignons : 22x10 ⁴ UFC.m ⁻³ (moy) Genre <i>Penicillium</i> majoritaire Bactéries : 68,9x10 ³ UFC.m ⁻³ (moy) Endotoxines : 10980 EU.m ⁻³ (moy)	(Lehtinen et al., 2013)
Allemagne	Cabines de tri (A)	Champignons et bactéries	Identification microscopique	Champignons : 1,4x10 ⁵ UFC.m ⁻³ (med) <i>A. fumigatus</i> : 1,7x10 ⁴ UFC.m ⁻³ (med) Bactéries : 1,1x10 ⁵ UFC.m ⁻³ (med)	(Reinthal et al., 1999)
Danemark	Centre de tri des papiers recyclables (A)	Champignons, spores fongiques, bactéries et endotoxines	Identification macroscopique (champignons) Identification métabolique (bactéries)	Champignons : 15x10 ³ UFC.m ⁻³ (med) Spores : 14x10 ³ UFC.m ⁻³ (med) Bactéries : 3,6x10 ³ UFC.m ⁻³ (med) Endotoxines : 9,7 EU.m ⁻³ (med) Genre <i>Penicillium</i> majoritaire	(Breum et al., 1999)
Corée du sud	Recyclage (A)	Champignons, bactéries, bactéries Gram négatif	-	Champignons : 4,3x10 ⁴ ±1,4x10 ⁴ UFC.m ⁻³ (moy) Bactéries : 3,1x10 ⁴ ±5,8x10 ³ UFC.m ⁻³ (moy) Bactéries Gram négatif : 3,2x10 ⁴ ±5,9x10 ³ UFC.m ⁻³ (moy)	(Park et al., 2013)
Pays-Bas	Compostage (A)	Champignons, bactéries Gram négatif, endotoxines	-	Champignons : 2x10 ⁵ UFC.m ⁻³ (moy) Bactéries Gram négatif : 6,7x10 ³ UFC.m ⁻³ (moy)	(van Tongeren et al., 1997)
Allemagne	Compostage (A)	Champignons et bactéries	Identification microscopique	Champignons : 6,5x10 ³ UFC.m ⁻³ (med) <i>A. fumigatus</i> : 1,2x10 ² UFC.m ⁻³ (med) Bactéries : 4,5x10 ³ UFC.m ⁻³ (med)	(Reinthal et al., 1999)
Allemagne	Compostage (A)	Spores de champignons, bactéries, actinomycètes	-	Spores : 10 ⁷ UFC.m ⁻³ Bactéries : 10 ⁷ UFC.m ⁻³ Actinomycètes : 10 ⁵ UFC.m ⁻³	(Bünger et al., 2000)
Canada	Collecte des conteneurs de	Champignons et bactéries	-	Champignons : 6500 UFC.m ⁻³ (med)	(Lavoie et

	déchets recyclables (A)			Bactéries : 5250 UFC.m ⁻³ (<i>med</i>)	<i>al.</i> , 2006)
Canada	Collecte des conteneurs de déchets recyclables (I)	Champignons et bactéries	-	Champignons : 12850 UFC.m ⁻³ (<i>med</i>) Bactéries : 5600 UFC.m ⁻³ (<i>med</i>)	(Lavoie et al. 2006)
Danemark	Collecte des papiers recyclables (A)	Champignons, bactéries et endotoxines	Identification macroscopique (champignons) Identification métabolique (bactéries)	Champignons : 0,91- 14x10 ³ UFC.m ⁻³ (<i>med</i>) Bactéries : 0,1-4x10 ³ UFC.m ⁻³ (<i>med</i>) Endotoxines : 0,23-3,8 EU.m ⁻³ (<i>med</i>)	(Breum et al., 1999)
Corée du sud	Collecte des déchets (A)	Champignons, bactéries, bactéries Gram négatif	-	Champignons : 3,7x10 ³ ±9,7x10 ² UFC.m ⁻³ (<i>moy</i>) Bactéries : 1,1x10 ⁴ ±2,8x10 ³ UFC.m ⁻³ (<i>moy</i>) Bactéries Gram négatif : 1,2x10 ⁴ ±5,2x10 ³ UFC.m ⁻³ (<i>moy</i>)	(Park et al., 2013)
Allemagne	Collecte des déchets verts (A)	Spoires de champignons, bactéries, actinomycètes	-	Spoires : 10 ⁵ UFC.m ⁻³ Bactéries : 10 ⁵ UFC.m ⁻³ Actinomycètes : 10 ⁴ UFC.m ⁻³	(Bünger et al., 2000)
Danemark	Collecte des déchets (A)	Bactéries et champignons	Culture suivi de spectrométrie de masse MALDI-TOF	Bactéries : 1,1 × 10 ³ UFC.m ⁻³ (<i>moy</i>) Genres majoritaires : <i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Brevibacterium</i> Champignons : 5,7 × 10 ³ UFC.m ⁻³ (<i>moy</i>) Genres majoritaires : <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>	(Madsen et al., 2016)
Danemark	Collecte des déchets (I)	Bactéries et champignons	Culture suivi de spectrométrie de masse MALDI-TOF	Bactéries : 261 UFC.m ⁻³ (<i>moy</i>) Genres majoritaires : <i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Brevibacterium</i> Champignons : 1,2 × 10 ³ UFC.m ⁻³ (<i>moy</i>) Genres majoritaires : <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>	(Madsen et al., 2016)
Finlande	Centre de transfert des déchets (A)	Champignons, bactéries et endotoxines	Identification microscopique	Champignons : 3500 UFC.m ⁻³ (<i>moy</i>) Bactéries : 1190 UFC.m ⁻³ (<i>moy</i>) Endotoxines : 449 EU.m ⁻³ (<i>moy</i>) Genre <i>Penicillium</i> majoritaire	(Lehtinen et al., 2013)
Pays-Bas	Centre de transfert des déchets (A)	Champignons, bactéries, endotoxines	-	Champignons : 10 ⁶ UFC.m ⁻³ < (<i>moy</i>) Bactéries : 2,1x10 ⁵ UFC.m ⁻³ (<i>moy</i>) Endotoxines : 5,6 ng.m ⁻³ (<i>moy</i>)	(van Tongeren et al.,

Corée du sud	Transferts des déchets (A)	Champignons, bactéries, bactéries Gram négatif	-	Champignons : $1,0 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^4$ UFC.m ⁻³ (moy) Bactéries : $1,7 \times 10^4 \pm 8,0 \times 10^3$ UFC.m ⁻³ (moy) Bactéries Gram négatif : $2,2 \times 10^4 \pm 9,5 \times 10^3$ UFC.m ⁻³ (moy)	1997) (Park <i>et al.</i> , 2013)
Allemagne	Centre d'enfouissement (A)	Champignons et bactéries	Identification microscopique	Champignons : $2,0 \cdot 10^3$ UFC.m ⁻³ (med) <i>A. fumigatus</i> : $2,7 \times 10^1$ UFC.m ⁻³ (med) Bactéries : $6,1 \cdot 10^3$ UFC.m ⁻³ (med)	(Reinthalder <i>et al.</i> , 1999)
Portugal	Centre d'incinération des déchets (A)	Champignons	Identifications sur critères macro et microscopiques	3540 UFC.m ⁻³ (nb UCF) Genre <i>Penicillium</i> majoritaire	(Viegas <i>et al.</i> , 2014)

Objectifs de la thèse

Le secteur du tri et recyclage de déchets est en pleine expansion, le nombre d'installations augmentant, le nombre de salariés exposés aux bioaérosols est lui aussi en augmentation. Des effets néfastes sur la santé suite à l'exposition de ces bioaérosols ont été observés. Pourtant, le secteur est très peu étudié. A l'heure actuelle, seules quelques mesures ont été effectuées dans des centres de tri des déchets. Les analyses de dénombrement des microorganismes cultivables ont montré des concentrations importantes notamment pour les moisissures (tableau 2). Or, ces techniques basées sur le dénombrement des microorganismes suivi de l'identification des colonies sous-estiment la diversité et la quantité de microorganismes présents dans les bioaérosols. La métagénomique basée sur les NGS constitue une méthode qui permet de s'affranchir des limites de la culture et pourrait représenter une bonne alternative. Cette technique a déjà été utilisée par exemple pour étudier la composition des bioaérosols dans plusieurs secteurs tels que l'air urbain (Yamamoto *et al.*, 2012), les mines de charbons (Guo *et al.*, 2015), les élevages (Nonnenmann *et al.*, 2010) ou le compostage (Mbareche *et al.*, 2017). Cette technique n'était pas utilisée au laboratoire. Par conséquent, avant d'utiliser cette méthode, il était important de l'évaluer pour définir un processus de mesure robuste et d'en identifier les limites.

Dans ce contexte, les objectifs de la thèse sont les suivants :

- 1) concevoir et étudier les caractéristiques d'une méthode d'analyse de la biodiversité dans les bioaérosols ;
- 2) évaluer la biodiversité, bactérienne et fongique, dans les bioaérosols émis dans des entreprises du secteur du tri des déchets ;
- 3) identifier les principaux déterminants de la diversité microbienne dans les entreprises investiguées (conditions atmosphériques, intensité de l'activité, nature de l'activité, influence du jour de prélèvement....).

Déroulement des travaux

Pour répondre aux différents objectifs, les travaux ont été organisés en plusieurs parties. La première étape a été consacrée à l'étude de faisabilité de la méthode de séquençage à haut débit pour l'analyse des bioaérosols émis en situations professionnelles. L'étude des travaux publiés a permis de faire le point sur les méthodes utilisables pour mesurer la biodiversité dans les bioaérosols et d'en appréhender les limites. Elle a aussi permis de concevoir une méthode de mesure de la biodiversité microbienne par des méthodes de métagénomique (NGS). Des échantillons ont été prélevés dans un premier centre de tri avant le début de la thèse. Ce premier travail a permis d'introduire la technique au laboratoire, de mettre en place les outils bio-informatiques pour l'analyse des séquences et l'analyse des résultats qui seront nécessaires pour la suite des travaux. Cela a également permis d'obtenir des premières données de biodiversité par séquençage à haut débit dans le secteur investigué et de montrer la faisabilité du processus global de mesure envisagé sur des échantillons de bioaérosols. Cette première partie est l'objet de la partie 2.

Dans une seconde partie, la méthode a été caractérisée en analysant la biodiversité fongique via différentes techniques dans des bioaérosols expérimentaux générés en laboratoire. Un consortium de quatre souches de moisissures (*Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium brevicompactum* et *Wallemia melicolla*) a été généré par bullage dans un banc de génération développé à l'INRS (Simon *et al.*, 2011, 2013). Les paramètres de génération ont été standardisés pour garantir la répétabilité et la reproductibilité des bioaérosols produits. Pour définir les avantages et les limites de différents outils analytiques de la biodiversité, différentes techniques ont été comparées : 1) culture vs séquençage à haut débit, 2) séquençage de l'ADNr 18S vs région ITS2, 3) assignation des séquences par utilisation de l'algorithme BLAST vs méthode Wang exécutée sous Mothur. L'efficacité de deux kits d'extraction d'ADN a également été comparée pour définir la meilleure méthode à utiliser. Les quatre souches utilisées appartiennent aux genres fongiques majoritaires retrouvés dans les bioaérosols prélevés dans le premier centre de tri. Les résultats ont montré une complémentarité entre les résultats obtenus par culture et par séquençage à haut débit. Cette partie a permis de choisir la cible de séquençage (ITS2) et la méthode d'assignation des séquences (BLAST) qui seront utilisées pour la suite des travaux. Les résultats obtenus étant méthode-dépendants, cela a également permis de démontrer la nécessité de standardiser la méthode d'analyse pour les études de comparaison. Ces travaux sont détaillés dans la partie 3.

Le processus de mesure (appareil de prélèvement, temps et débit de prélèvement) défini dans le chapitre 1 et le protocole d'analyse déterminé dans le chapitre 2 ont été déployés sur le terrain. Pendant un an, la biodiversité dans les bioaérosols émis dans un deuxième centre de tri a été investiguée. La campagne a été réalisée dans un centre de tri d'ordures ménagères avec des mesures effectuées tous les mois à cinq points différents répartis au cœur des activités ainsi que dans un bureau non contaminé par les déchets, représentant la référence intérieure. Outre la mesure de la biodiversité, la campagne a permis de collecter des informations sur les concentrations en microorganismes cultivables, la température et l'humidité relative de l'air, la quantité de poussière inhalable et des données sur la production de l'entreprise. Des mesures ont également été effectuées toutes les semaines pour un mois précis et tous les jours pour une semaine précise. Il est apparu une grande complexité des bioaérosols bactériens et fongiques avec des variations

importantes en termes de nombre de taxons et de leur proportion au cours de l'année de prélèvement. Cependant, certains taxons majoritaires (phylum ou genre) ont été retrouvés à tous les points dans l'entreprise et à chaque mois de prélèvement. Pour expliquer l'origine de la variation de la biodiversité, une analyse statistique approfondie a été menée. Cette analyse a permis de mettre en évidence la différence de composition bactérienne et fongique entre les points dans l'entreprise et la référence intérieure mais pas entre les différentes localisations du procédé de tri des déchets. La biodiversité bactérienne est apparue comme non prédictible par les méthodes habituelles de la statistique (réseaux bayésien, régression multiple, classification de Wang, modèle linéaire général ou moindres carrés partiels). Les données environnementales acquises lors de la campagne ne permettent pas d'expliquer ni de prédire les variations observées. A ce stade, il semblerait que le moment de prélèvement conditionne les résultats de biodiversité bactérienne. Pour la biodiversité fongique, l'approche par réseau bayésien a montré un regroupement des échantillons par saisons. La globalité des résultats de la campagne de prélèvement est présentée dans les parties 3 et 4.

Références Bibliographiques

- ADEME (2017). Déchets, les chiffres clés. Editions 2016. 1-96.
- ADEME and FNADE (2012). Etats des lieux des centres de tri des déchets ménagers non dangereux des activités économiques en France: données 2010. 1-67.
- Adhikari, A., Gupta, J., Wilkins, J. R., Olds R. L., Indugula, R., Cho, K. J., Li, C., Yermakov, M. (2011). Airborne microorganisms, endotoxin, and (1-3)-beta-D-Glucan exposure in greenhouses and assessment of respiratory symptoms among workers. *Annals of Occupational Hygiene* 55: 272-285.
- AFNOR (1993). NF X43-276 (EN 481)- Atmosphère des lieux de travail: définition des fractions de taille pour le mesurage des particules en suspension dans l'air. Association française de normalisation: 1-13.
- AFNOR (2000). NF X43-247 (EN 13098)- Atmosphère des lieux de travail: règles pour le mesurage des micro-organismes et d'endotoxine en suspension dans l'air. Association française pour la normalisation: 1-28.
- AFNOR (2003). NF X43-240 (EN 14031)- Atmosphère des lieux de travail: détermination des endotoxines en suspension dans l'air. Association française de normalisation: 1-13.
- AFNOR (2012). NF X43-287 (EN 1540)- Exposition sur les lieux de travail: terminologie. Association française de normalisation: 1-39.
- Arfi, Y., Marchand, C., Wartel, M., Record, E. (2012) Fungal diversity in anoxic sulfidic sediments in a mangrove soil. *Fungal Ecol* 5: 282-285.
- Beguín, H. and Nørdal, N. (1994). Mould biodiversity in homes I. Air and surface analysis of 130 dwellings. *Aerobiologia* 10: 157-166.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* 10: 189.
- Bik, H. M., Porazinska, D. L., Creer, S., Caporaso, J. G., Knight, R., Thomas W. K. (2012). Sequencing our way towards understanding global eukaryotic biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution* 27: 233-243.
- Bønløkke, J., Stridh, G., Sigsgaard, T., Kjaergaard, S., Löfstedt, H., Andersson, K., Bonefeld-Jørgensen, E., Jayatissa, M., Bodin, L., Juto, J., Møhlhave, L. (2006). Upper-airway inflammation in relation to dust spiked with aldehydes or glucan. *Scandinavian journal of work, environment and health* 32: 374-382.
- Brandl, H., Fricker-Feer, C., Ziegler, D., Mandal, J., Stephan, R., Lehner, A. (2014). Distribution and identification of culturable airborne microorganisms in a Swiss milk processing facility. *Journal of Dairy Science* 97: 240-246.
- Brenner, D. J., J. T. S. and R. Krieg N. R. (2001). Classification of procaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, second edition. Volume one: The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria. D. R. Boone and C. R. W., Springer: 27-31.
- Breum, N. O., H., Würtz, U. M., Ebbelhøj, N. (1999). Dustiness and bio-aerosol exposure in sorting recyclable paper. *Waste Management and Research* 17: 100-108.
- Breza-Boruta, B. (2012). Bioaerosols of the municipal waste landfill site as a source of microbiological air pollution and health hazard. *Ecological Chemistry and Engineering*. A 8:51-862.
- Bünger, J., Antlauf-Lammers, M., Schulz, T. G., Westphal, G. A., Müller, 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.
- Buttner, M. P., Willeke, K., Grinshpun, S. A. (1996). Sampling and analysis of airborne microorganisms. *Manual of environmental microbiology*. C. J. Hurst, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, S. L. D. and M. V. Walter, American society for microbiology: 929-640.
- Byeon, J. H., Park, C. W., Yoon, K. Y., Park, J. H., Hwang, J. (2008). Size distributions of total airborne particles and bioaerosols in a municipal composting facility. *Bioresource Technology* 99: 5150-5154.
- Cabaret, M. and Follet, S. (2013). Etat des lieux du parc des centres de tri de recyclables secs ménagers en France, ADEME: 1-52.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D. et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods* 7: 335-336.
- Chun, J., Kim, K.Y., Lee, J.H., Choi, Y. (2010). The analysis of oral microbial communities of wild-type and toll-like receptor 2-deficient mice using a 454 GS FLX Titanium pyrosequencer. *BMC Microbiol.* 10,101.
- Claassen, S., Du Toit, E., Kaba, M., Moodley, C., Zar, H. J., Nicol, M. P. (2013). A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits for extraction of DNA from faecal samples. *Journal of Microbiological Methods* 94: 103-110.

Cooley, J. D., Wong, W. C., Jumper, C. A., Straus, D. C. (1998). Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *Occupational and Environmental Medicine* 55: 579-584.

Crook, B. (1995). Chapter 9: inertial samplers: biological perspectives. *Bioaerosols Handbook*. C. S. Cox and C. M. Wathes, CRC Press 247-259.

Crook, B. (1995). Chapter 10: non-inertial samplers: biological perspectives. *Bioaerosols handbook*. C. S. Cox and C. M. Wathes, CRC Press 269-283.

Crook, B. and Sherwood-Higham, J. L. (1997). Sampling and assay of bioaerosols in the work environment. *Journal of Aerosol Science* 28: 417-426.

Dallongeville, A., Le Cann, P., Zmirou-Navier, D., Chevrier, C., Costet, N., Annesi-Maesano, I., Blanchard, O. (2015). Concentration and determinants of molds and allergens in indoor air and house dust of French dwellings. *Science of The Total Environment* 536:964-972.

Danielsen, L., Thürmer, A., Meinicke, P., Buée, M., Morin, E. *et al.* (2012) Fungal soil communities in a young transgenic poplar plantation form a rich reservoir for fungal root communities. *Ecol Evol* 2: 1935-1948.

Dannemiller, K. C., Lang-Yona, N., Yamamoto, N., Rudich, Y., Peccia, J. (2014). Combining real-time PCR and next-generation DNA sequencing to provide quantitative comparisons of fungal aerosol populations. *Atmospheric Environment* 84: 113-121.

Dannemiller, K. C., Reeves, D., Bibby, K., Yamamoto, N., Peccia, J. (2014). Fungal High-throughput Taxonomic Identification tool for use with Next-Generation Sequencing (FHiTINGS). *Journal of Basic Microbiology* 54: 315-321.

Dawson, M. E. (1995). A wealth of options: choosing LAL test method. *LAL update* 13(3).

Dean, T. R., Betancourt, D., Menetrez, M. Y. (2004). A rapid DNA extraction method for PCR identification of fungal indoor air contaminants. *Journal of Microbiological Methods* 56: 431-434.

Desneux, J. and Pourcher, A. M. (2014). Comparison of DNA extraction kits and modification of DNA elution procedure for the quantitation of subdominant bacteria from piggery effluents with real-time PCR. *MicrobiologyOpen* 3: 437-445.

Deutschbauer, A. M., Chivian, D., Arkin, A. P. (2006). Genomics for environmental microbiology. *Current Opinion in Biotechnology* 17(3): 229-235.

Di Bella, J. M., Bao, Y., Gloor, G. B., Burton, J. P., Reid, G. (2013). High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. *Journal of Microbiological Methods* 95: 401-414.

Dong, Q., Nelson, D.E., Toh, E., Diao, L., Gao, X., Fortenberry, J.D., Van der Pol, B. (2011). The microbial communities in male first catch urine are highly similar to those in paired urethral swab specimens. *PLoS One* 6, e19709.

Douterelo, I., Boxall, J. B., Deines, P., Sekar, R., Fish, K. E., Biggs, C. A. (2014). Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems. *Water Research* 65: 134-156.

Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D. (2003). Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Annals of Occupational Hygiene* 47: 187-200.

Duquenne, P., G. Marchand, G., Duchaine, C. (2012). Measurement of endotoxins in bioaerosols at workplace: a critical review of literature and a standardization issue. *Annals of Occupational Hygiene* 57:137-172.

Dybwad, M., Skogan, G., Blatny, J. M. (2014). Temporal variability of the bioaerosol background at a subway station: concentration level, size distribution, and diversity of airborne bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 257-270.

Eduard, W. (2009). Fungal spores: a critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. *Critical Reviews in Toxicology* 39: 799-864.

Evans, T. and Seviour, R. (2012). Estimating biodiversity of fungi in activated sludge communities using culture-independent methods. *Microbial Ecology* 63: 773-786.

Fahlgren, C., Bratbak, G., Sandaa, R. A., Thyraug, R., Zweifel, U. L. (2010). Diversity of airborne bacteria in samples collected using different devices for aerosol collection. *Aerobiologia* 27: 107-120.

Fakruddin, M. and Mannan K. S. B. (2013). Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments. *Ceylon Journal of Science* 42:19-33.

Frączek, K. and Kozdrój, J. (2016). Strain differentiation of airborne opportunistic microorganisms within a municipal landfill area as assessed by PCR MP method. *Aerobiologia* 32: 499-511.

Fröhlich-Nowoisky, J., Pickersgill, D. A., Després, V. R., Pöschl, U. (2009). High diversity of fungi in air particulate matter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 12814-12819.

Gihring, T. M., Green, S. J., Schadt, C. W. (2012). Massively parallel rRNA gene sequencing exacerbates the potential for biased community diversity comparisons due to variable library sizes. *Environmental Microbiology* 14: 285-290.

Giusti, L. (2009). A review of waste management practices and their impact on human health. *Waste Management* 29: 2227-2239.

Gladling, T. L. and Gwyther, C. L. (2017). A study of the potential release of bioaerosols from containers as a result of reduced frequency residual waste collections. *Science of The Total Environment* 576: 481-489.

- Grad, Y.H., Lipsitch, M., Feldgarden, M., Arachchi, H.M., Cerqueira, G.C. *et al.* (2012). Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 3065–3070.
- Griffiths, W. D. and DeCosmo, G. A. L. (1994). The assessment of bioaerosols: A critical review. *Journal of Aerosol Science* 25: 1425-1458.
- Guo, H., Yu, Z., Zhang, H. (2015). Phylogenetic diversity of microbial communities associated with coalbed methane gas from Eastern Ordos Basin, China. *International Journal of Coal Geology* 150–151: 120-126.
- Guo, X., Wu, P., Ding, W., Zhang, W., Li, L. (2014). Reduction and characterization of bioaerosols in a wastewater treatment station via ventilation. *Journal of Environmental Sciences* 26: 1575-1583.
- Gurtler, V. and Stanisich (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16s-23s rDNA spacer region. *Microbiology* 142: 3-16.
- Haugland, R. A., N. Brinkman and S. J. Vesper (2002). "Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis." *Journal of Microbiological Methods* 50(3): 319-323.
- Heldal, K. K., A. S. Halstensen, J. Thorn, P. Djupesland, I. Wouters, W. Eduard and T. S. Halstensen (2003). "Upper airway inflammation in waste handlers exposed to bioaerosols." *Occupational and Environmental Medicine* 60(6): 444-450.
- Hensel, A. and Petzoldt, K. (1995). Chapter 13: Biological and biochemical analysis of bacteria and viruses. *Bioaerosols Handbook*. C. S. Cox and C. M. Wathes, Lewis Publishers: 335-361.
- Hinds W.C. (1999) *Aerosol Technology: Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles* (2nd ed.), Wiley, New York pp. 233-259.
- Hoisington, A. J., Maestre, J. P., King, M. D., Siegel, J. A., Kinney, K. A. (2014). Impact of sampler selection on the characterization of the indoor microbiome via high-throughput sequencing. *Building and Environment* 80: 274-282.
- Hospodsky, D., Qian, J., Nazaroff, W. W., Yamamoto, N., Bibby, K., Rismani-Yazdi, H., Peccia, J. (2012). Human occupancy as a source of indoor airborne bacteria. *PLoS ONE* 7: e34867.
- Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486:207–214.
- Irga, P. and Torpy, F. (2015). A survey of the aeromycota of Sydney and its correspondence with environmental conditions: grass as a component of urban forestry could be a major determinant. *Aerobiologia* 32: 171-185.
- Jacob, J. H., Irshaid, F. I., Alhalib, M. A. (2016). Estimation and identification of airborne bacteria and fungi in the outdoor atmosphere of Al-Mafraq area, Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences* 9: 3-10.
- Just, N., Kirychuk, S., Gilbert, Y., Létourneau, V., Veillette, M., Singh, B., Duchaine, C. (2011). Bacterial diversity characterization of bioaerosols from cage-housed and floor-housed poultry operations. *Environmental Research* 111: 492-498.
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58: 169-188.
- Kristiansen, A., Saunders, A. M., Hansen, A. A., Nielsen, P. H., Nielsen, J. L. (2012). Community structure of bacteria and fungi in aerosols of a pig confinement building. *FEMS Microbiology Ecology* 80: 390-401.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 95-125.
- Kumari, P. and Choi, H. (2015). Manure removal system influences the abundance and composition of airborne biotic contaminants in swine confinement buildings. *Environmental Monitoring and Assessment* 187: 1-10.
- Kumari, P., Woo, C., Yamamoto, N., Choi, H. L. (2016). Variations in abundance, diversity and community composition of airborne fungi in swine houses across seasons. *Nature Scientific Reports* 6: 37929.
- LaMontagne, M. G., Michel, F. C., Holden, P. A., Reddy, C. A. (2002). Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis. *Journal of Microbiological Methods* 49: 255-264.
- Laroche, C. and Michaud, P. (2007). New Developments and Prospective Applications for (1,3) Glucans. *Recent Patents on Biotechnology* 1: 59-73.
- Lavoie, J., Dunkerley, C. J., Kosatsky, T., Dufresne, A. (2006). Exposure to aerosolized bacteria and fungi among collectors of commercial, mixed residential, recyclable and compostable waste. *Science of The Total Environment* 370: 23-28.
- Lecointre, G. and Le Guyader, H. (2006). Introduction. *Classification phylogénétique du vivant*. L. Guillaume and LeGuyader, Belin: 11-47.
- Lee, S., An, C., Xu, S., Lee, S., Yamamoto, N. (2016). High-throughput sequencing reveals unprecedented diversities of *Aspergillus* species in outdoor air. *Letters in Applied Microbiology* 63: 165-171.
- Lehtinen, J., Tolvanen, O., Nivukoski, U., Veijanen, A., Hänninen, K. (2013). Occupational hygiene in terms of volatile organic compounds (VOCs) and bioaerosols at two solid waste management plants in Finland. *Waste Management* 33: 964-973.

- Li, K. (2011). Molecular comparison of the sampling efficiency of four types of airborne bacterial samplers. *Science of The Total Environment* 409: 5493-5498.
- Liang, L., He, K., Duan, F. (2012). Progress on quantitative assessment methods of biological aerosols in the atmosphere. *Biogeosciences Discuss.* 9: 1511-1528.
- Lin, W., Yu, Z., Zhang, H., Thompson, I. P. (2014). Diversity and dynamics of microbial communities at each step of treatment plant for potable water generation. *Water Research* 52: 218-230.
- Liu, B. R., Jia, G. M., Chen, J., Wang, G. (2006). A Review of methods for studying microbial diversity in soils. *Pedosphere* 16: 18-24.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., Forney, L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4516-4522.
- MacNaughton, S. J., Stephen, J. R., Venosa, A. D., Davis, G. A., Chang, Y. J., White, D. C. (1999). Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3566-3574.
- Madsen, A. M., Alwan, T., Ørberg, A., Uhrbrand, K., Jørgensen, M. B. (2016). Waste workers' exposure to airborne fungal and bacterial species in the truck cab and during waste collection. *Annals of Occupational Hygiene* 60:651-668.
- Madsen, A. M., Zervas, A., Tendal, K., Nielsen, J. L. (2015). Microbial diversity in bioaerosol samples causing ODTs compared to reference bioaerosol samples as measured using illumina sequencing and MALDI-TOF. *Environmental Research* 140: 255-267.
- Madureira, J., Paciência, I., Rufo, J. C., Pereira, C., Teixeira, J. P., de Oliveira Fernandes, E. (2015). Assessment and determinants of airborne bacterial and fungal concentrations in different indoor environments: Homes, child day-care centres, primary schools and elderly care centres. *Atmospheric Environment* 109: 139-146.
- Malta-Vacas, J., Viegas, S., Sabino, R., Viegas, C. (2012). Fungal and microbial volatile organic compounds exposure assessment in a waste sorting plant. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 75: 1410-1417.
- Martinez, K., Rao, C., Burton, N. (2004). Exposure assessment and analysis for biological agents. *Grana* 43: 193-208.
- Mbareche, H., Veillette, M., Bonifait, L., Dubuis, M. E., Benard, Y., Marchand, G., Bilodeau, G. J., Duchaine, C. (2017). A next generation sequencing approach with a suitable bioinformatics workflow to study fungal diversity in bioaerosols released from two different types of composting plants. *Science of The Total Environment* 601: 1306-1314.
- Méheust, D., Le Cann, P., Reboux, G., Millon, L., Gangneux, J. P. (2014). Indoor fungal contamination: Health risks and measurement methods in hospitals, homes and workplaces. *Critical Reviews in Microbiology* 40: 248-260.
- Miletto, M. and Lindow, S. E. (2015). Relative and contextual contribution of different sources to the composition and abundance of indoor air bacteria in residences. *Microbiome* 3: 1-14.
- Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. W. Ray, Academic Press. Volume 155: 335-350.
- Nations Unies (1992). Convention sur la diversité biologique: 3.
- Nieguitsila, A., Deville, M., Jamal, T., Halos, L., Berthelemy, M., Chermette, R., Latouche, S., Arné, P., Guillot, J. (2007). Evaluation of fungal aerosols using Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE) and comparison with culture. *Journal of Microbiological Methods* 70: 86-95.
- Nielsen, E. M., Nielsen, B. H., Breum, N. O. (1995). Occupational bioaerosol exposure during collection of household waste. *Annals of agricultural and environmental medicine* 2: 53-59.
- Nilsson, R. H., Kristiansson, E., Ryberg, M., Hallenberg, N., Larsson, K. H. (2008). Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics Online* 4: 193-201.
- Nonnenmann, M. W., Bextine, B., Dowd, S. E., Gilmore, K., Levin, J. L. (2010). Culture-independent characterization of bacteria and fungi in a poultry bioaerosol using pyrosequencing: a new approach. *Journal of occupational and environmental hygiene* 7: 693-699.
- Nyren, P., Pettersson, B., Uhlen, M. (1993). Solid Phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay. *Analytical Biochemistry* 208: 171-175.
- Park, D., Ryu, S., Kim, S., Byun, H., Yoon, C., Lee, K. (2013). Airborne bacteria and fungi associated with waste-handling work. *International Journal of Occupational and Environmental Health* 19: 311-318.
- Pinto, M. J. d. V., Veiga, J. M., Fernandes, P., Ramos, C., Gonçalves, S., Velho, M. M. L. V., Guerreiro, J. S. (2015). Airborne microorganisms associated with packaging glass sorting facilities. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 78: 685-696.
- Porter, T. M. and Golding G. B. (2011). Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons? *New Phytologist* 192: 775-782.

Poulsen, O. M., Breum, N. O., Ebbenhøj, N., Hansen, Å. M., Ivens, U. I., van Lelieveld, D., Malmros, P., Matthiasen, L., Nielsen, B. H., Nielsen, E. M., Schibye, B., Skov, T., Stenbaek, E. I., Wilkins, K. C. (1995). Sorting and recycling of domestic waste. Review of occupational health problems and their possible causes. *Science of The Total Environment* 168: 33-56.

Quaiser, A., Zivanovic, Y., Moreira, D., López-García, P. (2011) Comparative metagenomics of bathypelagic plankton and bottom sediment from the Sea of Marmara. *ISME J* 5: 285-304.

Raghav, N., Shrivastava, J. N., Satsangi, G. P., Kumar R. (2015). Investigation on abundance of microbial communities in ambient air over urban site in semi arid region. *Journal of Energy Research and Environmental Technology* 2: 375-378.

Rahkonen, P. (1992). Airborne contaminants at waste treatment plants. *Waste Management & Research* 10: 411-421.

Rakotonirainy, M. S., Vilmon, L. B., Lavédrine, B. (2016). A methodology for detecting the level of fungal contamination in the French Film Archives vaults. *Journal of Cultural Heritage* 19: 454-462.

Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 142-160.

Reboux, G., Bellanger, A. P., Roussel, S., Grenouillet, F., Sornin, S., Piarroux, R., Dalphin, J. C., Million, L. (2009). Indoor mold concentration in Eastern France. *Indoor air* 19: 446-453.

Reeves, P.R., Liu, B., Zhou, Z., Li, D., Guo, D., Ren, Y., Clabots, C., Lan, R., Johnson, J.R., Wang, L. (2011). Rates of mutation and host transmission for an *Escherichia coli* clone over 3 years. *PLoS One* 6:e26907.

Reinthal, F. F., Haas, D., Feierl, G., Schlacher, R., Pichler-Semmelrock, F. P., Köck, M., Wüst, G., Feenstra, O., Marth, E. (1999). Comparative investigations of airborne culturable microorganisms in selected waste treatment facilities and in neighbouring residential areas. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* 202: 1-17.

Reponen, T. (2011). Methodologies for assessing bioaerosol exposures. *The British library: the world's knowledge*: 722-730.

Reponen, T., Willeke, K., Grinshpun, S., Nevalainen, A. (2011). Biological particle sampling. *Aerosol Measurement: Principles, Techniques, and Applications*, 3rd Edition. P. Kulkarni, P. A. Baron and K. Willeke, John Wiley and Sons: 549-570.

Samadi, S., Rietbroek, N., Dwars, R., Jamshidifard, A., Heederik, D., Wouters, I. (2011). Endotoxin and β -(1 $\rightarrow$ 3)-glucan exposure in poultry and ruminant clinics. *Journal of environmental monitoring* 13: 3254-3261.

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M. et al (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7537-7541.

Schloss, P. D. and Westcott, S. L. (2011). Assessing and improving methods used in Operational Taxonomic Unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 3219-3226.

Schlosser, O., Déportes, I. Z., Facon, B., Fromont, E. (2015). Extension of the sorting instructions for household plastic packaging and changes in exposure to bioaerosols at materials recovery facilities. *Waste Management* 46: 47-55.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 6241-6246.

Searl, A. and Crawford, J. (2012). Review of health risks for workers in the waste and recycling industry.

Sebők, F., Dobolyi, C., Bobvos, J., Szoboszlai, S., Kriszt, B., Magyar, D. (2015). Thermophilic fungi in air samples in surroundings of compost piles of municipal, agricultural and horticultural origin. *Aerobiologia* 32: 255-263.

Shen, F., Kai, W., Yao, M. (2013). Negatively and positively charged bacterial aerosol concentration and diversity in natural environments. *Chinese Science Bulletin* 58: 3169-3176.

Shendure, J. and Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26: 1135-1145.

Simon, X., Duquenne, P., Koehler, V., Piernot, C., Coulais, C. and Faure, M. (2011). Aerosolisation of *Escherichia coli* and associated endotoxin using an improved bubbling bioaerosol generator. *Journal of Aerosol Science*. 42 (8):517-531.

Simon, X. and Duquenne, P. (2013). Feasibility of generating peaks of bioaerosols for laboratory experiments. *Aerosol and Air Quality Research*. 13:877-886.

Somboonna, N., Assawamakin, A., Wilantho, A., Tangphatsornruang, S., Tongsim, S. (2012). Metagenomic profiles of free-living archaea, bacteria and small eukaryotes in coastal areas of Sichang island, Thailand. *BMC Genomics* 13 Suppl 7: S29.

Spurny, K. R. (1995). Chapter 12: Chemical analysis of bioaerosols. *Bioaerosols Handbook*. C. S. Cox and C. M. Wathes, Lewis Publishers: 317-334.

Švabenska, E. (2012). Systems for detection and identification of biological aerosols. *Defence Science Journal* 62: 404-411.

Sun, M., Ren, Q., Guan, G., Liu, Z., Ma, M., et al. (2011). Virulence of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces lilacinus* to the engorged female *Hyalomma anatolicum anatolicum* tick (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 180: 389-393.

Tolvanen, O. (2004). Effect of waste treatment technique and quality of waste on bioaerosols in Finnish waste treatment plants. *Jyväskylä studies in biological and environmental science* 144.

Tolvanen, O. K. (2001). Airborne bio-aerosols and noise in a dry waste treatment plant in Pietarsaari, Finland. *Waste Management & Research* 19: 108-114.

- Toprak, E., Veres, A., Michel, J.B., Chait, R., Hartl, D.L., Kishony, R. (2012). Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nat. Genet.* 44:101–105.
- Tsai, F. C., Macher, J. M., Hung, Y. Y. (2007). Biodiversity and concentrations of airborne fungi in large US office buildings from the BASE study. *Atmospheric Environment* 41: 5181-5191.
- Tuomisto, H. (2010) A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 1. Defining beta diversity as a function of alpha and gamma diversity. *Ecography* 33: 2–22.
- Uroz, S., Ioannidis, P., Lengelle, J., Cébron, A., Morin, E., *et al.* (2013) Functional assays and metagenomic analyses reveals differences between the microbial communities inhabiting the soil horizons of a Norway spruce plantation. *PLoS One* 8: e55929.
- van Burik, J. A. H., Schreckhise, R. W., White, T. C., Bowden, R. A., Myerson, D. (1998). Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Medical Mycology* 36: 299-303.
- van Tongeren, M., van Amelsfoort, L., Heederik, D. (1997). Exposure to organic dusts, endotoxins, and microorganisms in the municipal waste industry. *International Journal of Occupational and Environmental Health* 3: 30-36.
- Viegas, C., Gomes, A. Q., Abegão, J., Sabino, R., Graça, T., Viegas S. (2014). Assessment of fungal contamination in waste sorting and incineration—case study in Portugal. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 77: 57-68.
- Vishnivetskaya, T. A., Layton, A. C., Lau, M. C. Y., Chauhan, A., Cheng, K. R. *et al* (2014). Commercial DNA extraction kits impact observed microbial community composition in permafrost samples. *FEMS Microbiology Ecology* 87: 217-230.
- Voelkerding, K. V., Dames S. A., Durtschi, J. D. (2009). Next-Generation Sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical Chemistry* 55: 641-658.
- Walser, S. M., Gerstner, D. G., Brenner, B., Bünger, J., Eikmann, T., *et al.* (2015). Evaluation of exposure–response relationships for health effects of microbial bioaerosols – A systematic review. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 218: 577-589.
- Wang-Li, L., Li, Q., Byfield, G. E. (2012). Identification of bioaerosols released from an egg production facility in the southeast United States. *Environmental Engineering Science* 30: 2-10.
- Wei, M., Yu, Z., Zhang, H. (2015). Molecular characterization of microbial communities in bioaerosols of a coal mine by 454 pyrosequencing and real-time PCR. *Journal of Environmental Sciences* 30: 241-251.
- Whitehouse, C. A. and Hottel, H. E. (2007). Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Francisella tularensis* DNA from spiked soil samples. *Molecular and Cellular Probes* 21: 92-96.
- Whittaker, R. H. (1960) Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecological Monographs* 30:279–338.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51:221–271.
- Wolfe, A.J., Toh, E., Shibata, N., Rong, R., Kenton, K., Fitzgerald, M., Mueller, E.R., Schreckenberger, P., Dong, Q., Nelson, D.E., Brubaker, L. (2012). Evidence of uncultivated bacteria in the adult female bladder. *J. Clin. Microbiol.* 50: 1376–1383.
- Wylie, K.M., Truty, R.M., Sharpton, T.J., Mihindukulasuriya, K.A., Zhou, Y., Gao, H., Sodergren, E., Weinstock, G.M., Pollard, K.S. (2012). Novel bacterial taxa in the human microbiome. *PLoS One* 7, e35294.
- Yamamoto, N. and Bibby, K. (2014). Clustering of fungal community internal transcribed spacer sequence data obscures taxonomic diversity. *Environmental Microbiology* 16: 2491-2500.
- Yamamoto, N., Bibby, K., Qian, J., Hospodsky, D., Rismani-Yazdi, H., Nazaroff, W. W., Peccia, J. (2012). Particle-size distributions and seasonal diversity of allergenic and pathogenic fungi in outdoor air. *ISME J* 6: 1801-1811.
- Yao, M. and Mainelis, G. (2006). Effect of physical and biological parameters on enumeration of bioaerosols by portable microbial impactors. *Journal of Aerosol Science* 37: 1467-1483.
- Yu, Y., Yin, S., Kuan, Y., Xu, Y., Gao, X. (2015). Characteristics of airborne micro-organisms in a neurological intensive care unit: Results from China. *Journal of International Medical Research* 43: 332-340.

Partie 2

Essai préliminaire de faisabilité
du processus de prélèvements
et d'analyse d'échantillons de
bioaérosols

Partie 2: essai préliminaire de faisabilité du processus de prélèvements et d'analyse d'échantillons de bioaérosols

1. Résumé

L'objectif de ce chapitre était d'évaluer la faisabilité du séquençage à haut débit dans les études de biodiversité microbienne dans les bioaérosols émis en situation professionnelle. Des prélèvements de bioaérosols ont été effectués dans un centre de tri en France. Le centre investigué ne traite que des déchets dits « non dangereux » dont des journaux ou magazines ; emballages divers en plastiques, métal ou cartons ainsi que d'autres types de déchets provenant des entreprises (mobilier...). Le centre traite environ 4000 tonnes de déchets par mois et emploie environ 50 salariés pour les activités de tri réparties dans trois cabines de tri.

Dans une des cabines, dédiée au pré-tri des gros cartons, trois échantillons ont été prélevés simultanément par filtration avec des cassettes fermées de 37 mm contenant un filtre en polycarbonate. Les prélèvements ont été réalisés avec un débit de $10 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ pendant 5h. Un échantillon a également été collecté à distance des activités de la même manière que les trois autres pour constituer la référence dite « extérieure ». Après le prélèvement, les quatre échantillons ont été transportés réfrigérés à 4°C puis conservés au laboratoire avant leur analyse dans les 24h suivant leur réception. L'ADN a été extrait avec le kit FastDNA®SPIN kit for soil (MP Biomedicals,USA) pour ensuite être séquençé par un prestataire extérieur (INRA Transfert, France). Une région codant l'ADNr 16S bactérien a été séquençée avec la technologie MiSeq d'Illumina tandis que la région ADNr 18S spécifique des eucaryotes a été séquençée avec une plateforme 454 de Roche. Le traitement bioinformatique des séquences a également été réalisé par INRA Transfert avec deux pipelines d'analyse développés dans le logiciel de traitement de séquences Mothur (Schloss and Westcott,2009).

Les concentrations en ADN dans tous les échantillons étaient suffisantes pour permettre le séquençage (moyenne des concentrations mesurées par spectrophotométrie : $6 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Les résultats ont montré une différence de composition entre les bioaérosols prélevés dans la cabine de pré-tri et la référence extérieure et ce pour les biodiversités bactériennes et fongiques. Plus de 80% des lectures (reads) bactériennes ont pu être assignées au niveau du phylum et 50% au niveau du genre. Les principaux phyla retrouvés dans les bioaérosols émis dans la cabine étaient les Firmicutes (29%) et les Proteobacteria (35%). Les Actinobacteria et Bacteroidetes également en proportions importantes constituant 9% et 7% des lectures. Les dix OTU (Operational Taxonomic Unit ou unité taxinomique opérationnelle) eucaryotes majoritaires représentaient 95% des lectures dans les échantillons prélevés dans la cabine avec une prédominance des genres *Aspergillus* (21%) et *Penicillium* (64%) tandis que *Cladosporium spp.* représentait le genre majoritaire dans la référence extérieure (45%).

Cette première étude a permis de détecter 4 phyla et 112 genres bactériens ; 3 phyla et 22 genres fongiques. Les bioaérosols avaient une composition complexe supérieure à celle observée

dans les études précédentes utilisant les techniques par culture. D'après ces premiers résultats, il semblerait que la composition des bioaérosols émis dans la cabine ait une composition différente de celle de bioaérosol en absence de déchets. Ces données doivent être confirmées par une campagne de prélèvement réalisée à plus grande échelle. Le séquençage à haut débit est une méthode adaptée aux mesures de biodiversité des bioaérosols émis dans les centres de tri. Le processus global de mesure a pu être défini avec un prélèvement sur filtre polycarbonate dans une cassette fermée de 37 mm, à un débit de 10 L.min^{-1} pendant 5h. C'est ce protocole de mesure qui sera appliqué pour la poursuite des prélèvements de bioaérosols en milieux professionnels. La biodiversité eucaryote étant majoritairement composée de champignons, le séquençage d'une cible plus spécifique aux champignons comme la région ITS est envisagée.

2. Article 1: First metagenomic survey of the microbial diversity in bioaerosols emitted in waste sorting plants.

Jodelle Degois¹, Frederic Clerc¹, Xavier Simon¹, Cyril Bontemps², Pierre Leblond² and Philippe Duquenne^{1*}

¹Department of pollutant metrology, Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), Vandoeuvre-lès-Nancy 54500, France; ²Université de Lorraine, Institut National de la Recherche Agronomique, Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne (DynAMic), UMR INRA 1128, Nancy 54000, France

*Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: Philippe.Duquenne@inrs.fr

Submitted 19 April 2017; revised 6 July 2017; editorial decision 13 July 2017; revised version accepted 3 September 2017, *Annals of Work Exposures and Health*, 2017, doi: 10.1093/annweh/wxx075

ABSTRACT

Waste sorting activities are source of occupational bioaerosol exposures that are associated with several health disorders. New analytical tools, based on next generation sequencing (NGS) technologies, provide powerful methods to assess the microbial composition of bioaerosols. The objectives of the study were (1) to assess the feasibility and the repeatability of NGS based biodiversity measurements and (2) to study the microbial biodiversity using NGS in bioaerosols emitted in a waste sorting plant (WSP). Three stationary parallel samples were collected in a sorting cabin using closed-face cassettes equipped with polycarbonate membranes. Bacterial and fungal diversity was assessed by sequencing 16S and 18S rDNA genes using either Illumina sequencing or 454 pyrosequencing methods. At sampling point, airborne bacteria were dominated by Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria with prevailing genera assigned to unclassified *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas* and *Lactobacillus*. Airborne fungi were dominated by Ascomycota with prevailing genera assigned to *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Wallemia* and *Hemicarpenales*. The NGS biodiversity measurements revealed a higher biodiversity bioaerosols that previously reported for WSP in studies carried out using culture methods followed by identification of microorganisms. These results provide the first survey about taxonomic biodiversity in bioaerosols from WSPs using high-throughput sequencing.

Keywords: Waste sorting plant, Bioaerosol, Occupational exposure, Biodiversity, Next-generation sequencing, 16S rDNA Illumina sequencing, 18S rDNA 454 pyrosequencing

INTRODUCTION

Household waste sorting activities are source of occupational exposure to bioaerosols including bacteria, fungi, endotoxins, (1,3)- β -D-glucans as well as inhalable dust (Breum *et al.*, 1999 ; Gladding *et al.*, 2003 ; Hebisch and Linsel, 2012 ; Schlosser *et al.*, 2015). Studies carried out in waste sorting plants (WSP) reported health disorders such as non-allergic symptoms (chronic bronchitis and

mucous membrane irritations) as well as allergic symptoms (allergic asthma, allergic rhinitis and hypersensitivity pneumonitis) among the population of WSP workers exposed to bioaerosols (Gladding *et al.*, 2003; Ivens *et al.*, 1997; Perez *et al.*, 2006).

Bacteria, fungi and viruses found in bioaerosols at the workplaces, as well as the associated microbial compounds such as endotoxins, (1,3)- β -D-glucans, mycotoxins and allergens, were presented as the possible causative agents of occupational diseases (Douwes *et al.*, 2003 ; Eduard *et al.*, 2012). However, the complex composition of bioaerosols still prevents identifying the specific microbial agents responsible for health effects as well as their precise role in symptoms. As a consequence, the dose-response relationships have not yet been established for most of non-infectious airborne microorganisms and no occupational exposure limit values are available. Thus, defining the precise composition of the bioaerosols to which employees are exposed to would provide a better understanding of biological risks at the workplaces.

So far, the microbial biodiversity data published in (WSP) were obtained by cultivation of microorganisms on nutrient media prior to identification. The corresponding studies found that the dominant fungi belonged to *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Cladopsorium sp.* (Breum *et al.*, 1999; Lehtinen *et al.*, 2013; Tolvanen, 2001; Viegas *et al.*, 2014). However, the culture method underestimates the total number of microorganisms in samples as dead cells and microorganisms at viable but non cultivable (VBNC) state due to the selecting effect of culture media and cultivation conditions (Amann *et al.*, 1995; Heidelberg *et al.*, 1997). Thus, the cultured based biodiversity measurements previously performed in WSP surely have underestimated the real microbial taxon richness.

Advances in molecular biology and Next-generation sequencing (NGS) provided new powerful methods for biodiversity studies (Cuadros-Orellana *et al.*, 2013). These molecular methods were already used in bioaerosol studies carried out in different occupational environments such as composting facilities (Partanen *et al.*, 2010), wastewater treatment plants (Lin *et al.*, 2014), and swine houses (Kumari and Choi, 2015). NGS overcame the limitations of culture based methods and provided useful data (greater observed biodiversity, detection of non-preponderant taxa etc.) for a better understanding of the microbial communities to which workers may be exposed. However, the NGS have also some limitations due to the DNA extraction efficiency, PCR (Polymerase Chain Reaction) biases or the short size of the amplified DNA fragments which do not allow the identification at the species level. Nevertheless, the NGS could provide additional information as compared to culture-based methods (Yoo *et al.*, 2017). To date, metagenomics methods were not applied to investigate the microbial biodiversity found in WSP. The aims of the present study were (1) to assess the feasibility and the repeatability of NGS based biodiversity measurements in WSP and (2) to apply this method in order to study the bioaerosol microbial biodiversity in bioaerosols emitted in a WSP.

MATERIALS AND METHODS

Description of the WSP

Bioaerosol biodiversity was assessed in July 2014 in a French WSP sorting journal newspapers, papers, cardboards, food packaging and other sorting wastes (4000 tons per month). The WSP employed about 50 workers mainly dedicated to manual sorting in three cabins.

Bioaerosol sampling

Three stationary parallel samples were collected in a cardboard sorting cabin (SC) and one outdoor reference (OR) sample was also collected at about 50 m upwind far from the WSP boundary to determine the background level. Bioaerosols were sampled with 37 mm closed-face cassettes (CFC) equipped with a sterile polycarbonate filter (Nuclepore®, 0.8 µm pore size) and a backing cellulose pad (Millipore®, thick cellulose absorbent pad). The cassettes were connected to constant flow pumps (Bravo, Tecora, France) and sampling was performed at a flow rate of 10 L.min⁻¹. The flow rate was calibrated before and after sampling using a flow meter (Mass Flowmeter 4040, TSI Inc., USA). Sampling devices were placed at 1.7 m above ground level and the sampling was conducted for five hours during the work shift. Temperature and relative humidity were monitored using a portable device (Thermohygrometer B6285C Pocket, Fischer, France) at the beginning and at the end of each sampling. Bioaerosol samples were transported to the laboratory during the day of sampling using a cold box and were then stored at 4°C until analysis. All samples were analyzed within 24 hours after being collected.

DNA extraction

A volume of 10 mL of a sterile solution (0.01 % Tween 80 in ultra-pure water) was introduced into the cassettes by the inlet. The cassettes inlets and outlets were closed with a cap and placed on a rocker (Heildolph®, Multi-Reax shaker) at 2000 rpm for 20 min, at room temperature. DNA extraction was performed with 500 µL of the subsequent elution solution with FastDNA® SPIN kit for soil kit (MP Biomedicals, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions. The DNA concentration was measured using Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Illkirch, France). Mean concentrations observed in all samples was 6.17±1.30 ng.µL⁻¹. The DNA samples were stored at -20°C until sequencing.

DNA sequencing and sequence data analysis

DNA purification, amplification, sequencing and reads analysis were achieved by INRA Transfert Environnement (Narbonne, France). Bacterial 16S rDNA gene (V4-V5 variable region) was amplified using the universal primers F-GTGYCAGCMGCCGCGGTA and R-CCCGYCAATTCMTTTRAGT. The universal primers used for Eukaryota DNA amplification were w553 CTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGCGGTAA TTCCAGCTCCAA and w554 GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGGCAAAT GCTTTCGC, targeting the V1 variable region of Eukaryota 18S rDNA. Each PCR mixture consisted of: 5 µL of DNA template, 4 µL of dNTPs (25 mM), 1 µL of each primer (100 ng.µL⁻¹), and 0.5 µL of Taq polymerase in a total volume of 50 µL. A PCR cycle was 2 min at 95°C (denaturation step), 1 min at 56°C or 65°C for 18S or 16S rDNA amplification respectively (annealing step) followed by 1 min at 72°C (elongation step). Bacterial 16S rDNA was sequenced using MiSeq technology (Illumina, San Diego, USA). The Eukaryota 18S rDNA was sequenced using GS-FLX pyrosequencer (454 Life Sciences, Branford, CT, USA).

The preprocessing of sequence analysis was performed using a Mothur pipeline version 1.33.2 (Schloss *et al.*, 2009) developed by INRA Transfert Environnement. After trimming and denoising, barcodes, primers and homopolymers longer than 8 pb were removed. Chimera were detected and deleted using UNCHIME (Edgar *et al.*, 2011) executed in Mothur. Reads with 100 per cent of identity were clustered into a unique sequence. Then, sequences were clustered into

Operational Taxonomic Units (OTU) at a threshold of 97 % sequence similarity. Bacterial taxonomy assignments were performed using the Mothur platform ("average" method) using SILVA database. The ten dominant eukaryotic OTUs were identified at the genus rank at 95% sequence similarity using BLASTn algorithm in Genbank (NCBI database; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

The Shannon's index, H' , was calculated with the following formula: $H' = -\sum P_i \times \ln P_i$, where $P_i = N_i/N$, N_i is the OTU number in a genus and N is the total OTU number. The Simpson's index, D , was calculated with the following formula: $D = \sum (N_i \times (N_i - 1) / (N \times (N - 1)))$. The Simpson's index measures the probability that two OTU chosen randomly will be associated with the same taxon (in that case the genus). The more the index value is near the value 0, the more the taxa are present in different proportions. On the contrary, the more the index value is near 1, the more the taxa are present in the same proportion. The values of Shannon's index are between 0 and $\ln S$, the total taxa number and values of Simpson's index are between 0 and 1.

Repeatability of the biodiversity measurement process

The repeatability of the bioaerosol measurement process was assessed on the 16S rDNA OTUs found in the three parallel replicate samples collected in the SC. Simple descriptive statistics of the proportions of each phylum were calculated. The arithmetic mean (AM) and the arithmetic standard deviation (SD) allowed computing the coefficient of variation (SD / AM). The average coefficient of variation (CV) of all phyla was also computed and assumed as representing the degree of similarity between the three samples. The AM and the CV were also calculated for Shannon's and the Simpson's indexes from the replicates samples. The calculation of simple descriptive statistics of the proportions of each phylum revealed CV values below 10 % (data not shown). For example, the proportion of Proteobacteria was 34.57 % in SC1, 34.37 % in SC2 and 33.04 % in SC3 which corresponds to a CV(Proteobacteria) equals 2%. Furthermore, the average coefficient of variation of all phyla was 9%. Descriptive statistics calculated from the replicates samples regarding the proportions of phyla revealed CV values below 10 %. The calculated CV for the Shannon's and the Simpson's indexes were below 6 %. These statistics suggest that bacterial and Eukaryota biodiversity can be assumed as repeatable.

RESULTS

The biodiversity was estimated in the sorting cabin (SC) (three replicates) and compared to that of the outdoor reference (OR).

Environmental and working conditions

The temperatures monitored in July 2014 in the SC and in the OR were 28°C and 29°C, respectively. The relative humidity of the air at the same points was 51% and 46% respectively. During the sampling, the working activity in the WSP was continuous and regular and no particular malfunction such as stopping in the sorting line occurred. Two operators were working in the cardboard sorting cabin.

Assessment of biodiversity using deep sequencing

The outlines of high-throughput sequencing data obtained in the study are given in Table 3. For bacterial 16S rDNA, Illumina sequencing provided about 78,600 reads in the OR sample and

between 69,600 and 100,000 reads in the SC samples (Table 3). This corresponds to 581 OTU in the OR sample and between 842 and 1,233 OTU in the SC samples. More than 80% of the sequences were assigned to bacterial OTUs in all the samples. The Shannon's indexes were from 6.41 to 6.60 in the SC samples and 4.24 in the OR one (Table 3). In the three replicates, the mean Shannon's index was 6.48 ± 0.10 (CV=1.61%). The Simpson's indexes were 0.1 in the OR and 0.02 in the SC samples, indicating that dominant bacterial genera were present in the two areas. For Eukaryota 18S rDNA, 454 pyrosequencing provided about 6,600 reads for in the OR sample and between 14,546 and 21,206 reads for the SC samples (Table 3). This corresponded to 15 OTUs in the OR sample and about 40 OTUs in the SC. The Shannon's indexes were 1.83 in the OR and 1.25 ± 0.07 (CV=5.60%) in the SC. The Simpson's indexes were 0.25 in the OR and about 0.45 in the SC.

Table 3 Overview of high-throughput sequencing data obtained from bioaerosol samples taken in the WSP.

Parameters	SC1	SC2	SC3	OR
<i>Bacterial 16S rDNA^a</i>				
Number of reads	100,895	100,2115	69,655	78,603
Number of OTU	1233	1326	842	581
Number of unique sequences	218	233	255	262
Simpson's index	0.02	0.02	0.02	0.1
Shannon's index	6.43	6.60	6.41	4.24
<i>Eukaryota 18S rDNA^b</i>				
Number of reads	14,546	16,082	21,206	6,588
Number of OTU	38	42	41	15
Number of unique sequences	3	5	2	1
Simpson's index	0.44	0.46	0.49	0.25
Shannon's index	1.30	1.28	1.17	1.83

Bioaerosol samples were collected in the Sorting Cabin (SC) and in the Outdoor Reference (OR).

^a: Illumina sequencing; ^b: 454 pyrosequencing.

Taxonomic diversity of airborne bacterial communities

The phylogenetic taxonomy analysis assigned more than 80% of the reads at the phylum rank, 70% at the family rank and 60 % at the genus rank (see supplementary data Table S1).

The four main phyla found in bioaerosol samples were Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria and Bacteroidetes (Figure 13). They accounted for about 80% of the total reads for the SC and 83% for the OR. Unidentified 16S sequences represented 17% and 12% in the SC and in the OR, respectively. The other found phyla belonged to Chloroflexi, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus and Planctomycetes and account individually for less than 2.5 % of the total reads. Actinobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes showed higher proportions in the SC than in the OR (Figure 13). Indeed, Actinobacteria and Firmicutes appeared to be more preponderant in bioaerosols that were emitted in the SC. Proteobacteria were the predominant phylum in all samples and in higher proportion in the OR sample.

At the family rank (see supplemental data Table S2), the specific richness was higher in the SC (78 families) than in the OR (59 families) samples. Most of these families belonged to the Proteobacteria phylum (26 in the SC and 23 in the OR) which accounted for 32% of the reads in the SC and 58% in the OR. In addition, 25% of the reads were assigned to Firmicutes families in the SC whereas they only account for 6.3% in the OR. The 20 main families found in the sorting cabin are

represented in the Figure 14. The proportion of these families was between 9.34% (*Enterobacteriaceae*) and 0.83% (*Aerococcaceae*) in the SC and accounted for 57% of the bacterial reads. Others predominant families were *Staphylococcaceae* (6.0%) and *Pseudomonadaceae* (5.0%).

The analysis of sequences at the genus rank revealed 112 bacterial genera in the SC samples (Table S3). Dominant airborne bacteria in SC samples were unclassified *Enterobacteriaceae* (8.38 %), *Staphylococcus* (5.63 %), *Acinetobacter* (4.48 %), *Leuconostoc* (3.07 %), *Pseudomonas* (2.99 %), *Lactobacillus* (2.27 %), unclassified *Planococcaceae* (2.15 %) and *Brevibacterium* (2.04 %). The analysis of sequences at the genus rank also highlighted differences between SC and OR. In the SC, 11 genera were observed with a 20-fold higher than in the OR (see Table S3). These 11 genera accounted for 25% (< 1% in the OR) of total bacterial reads and belonged to *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Brevibacterium*.

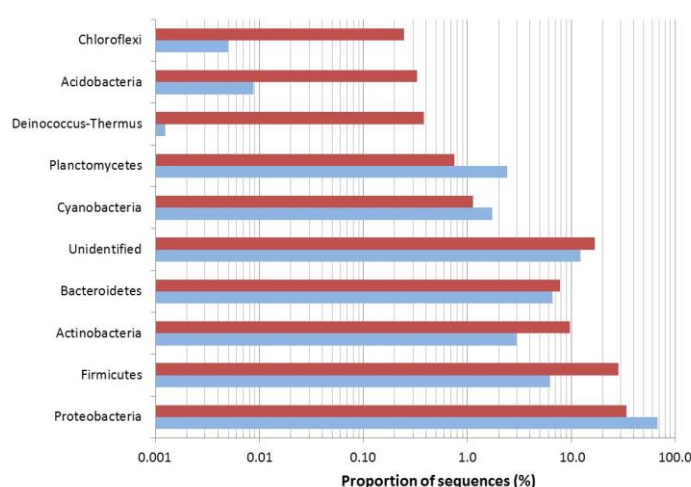


Figure 13 Bacterial biodiversity at the phylum Rank in bioaerosols from the WSP. Bioaerosol samples were collected in the Sorting Cabin (SC) and in the Outdoor Reference (OR). For practical reasons, only the mean of sequencing data from SC1, SC2 and SC3 are presented.

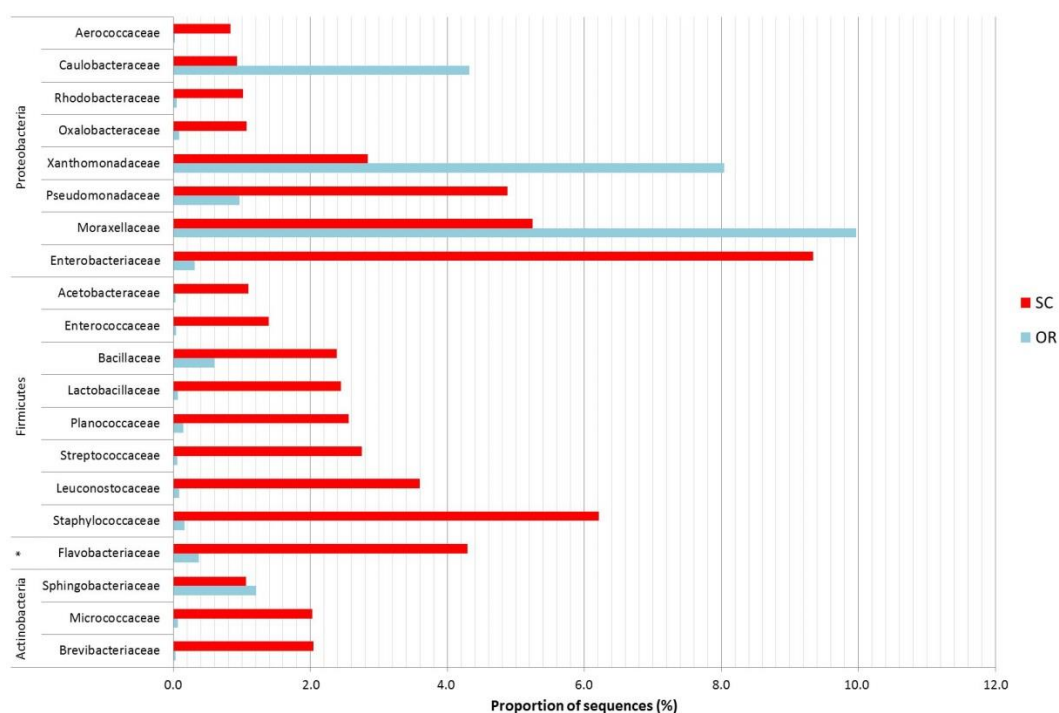


Figure 14 Bacterial biodiversity at the family rank in bioaerosols from the WSP.

Bioaerosol samples were collected in the Sorting Cabin (SC) and in the Outdoor Reference (OR). Data are given for the 20 dominant families found in SC samples. For practical reasons, only the mean of sequencing data from SC1, SC2 and SC3 are presented. *: corresponds to Bacteroidetes.

Biodiversity of airborne Eukaryota communities

The phylogenetic taxonomy analysis of 18S rDNA sequences revealed the occurrence of living organisms belonging to the Fungi and the Plantae kingdoms and assigned more than 99 % of the reads at the phylum rank in the 4 collected samples (Table S1).

In SC samples, Fungi represented 99.4 % of the reads and the remaining ones were assigned to Plantae (0.12 %) or remained unidentified (0.44 %). The three main fungal phyla found in bioaerosol samples were *Ascomycota* (91.1 %), an early diverging fungal lineage [*Mucor* and *Rhizopus*] (4.64 %) and *Basidiomycota* (3.70 %). Twenty two fungal genera were found. The ten dominant fungal OTUs represented 98.5 % of eukaryotic OTUs with a predominance of the *Penicillium*, *Aspergillus* and *Rhizopus* genera (Figure 15.a). *Wallemia* was the dominant *Basidiomycota* genus found in SC samples.

In the OR sample, Fungi and Plantae represented 70.0 % and 29.9 % of the reads, respectively, and the remaining ones were unidentified (0.1 %). The two fungal phyla found in bioaerosol samples were *Ascomycota* (59.0 %) and *Basidiomycota* (11.0 %); fungi belonging to the *early diverging fungal lineage* were not found. The dominant outdoor fungal genera were *Cladosporium* (45.2 %), unidentified *Ascomycota* (8.3 %), *Oligoporus* (7.3 %), unidentified *Basidiomycota* (3.6 %) and, *Penicillium* (3.5 %). Biodiversity also consisted of others Eukaryota such as Viridiplantae (Figure 15.b).

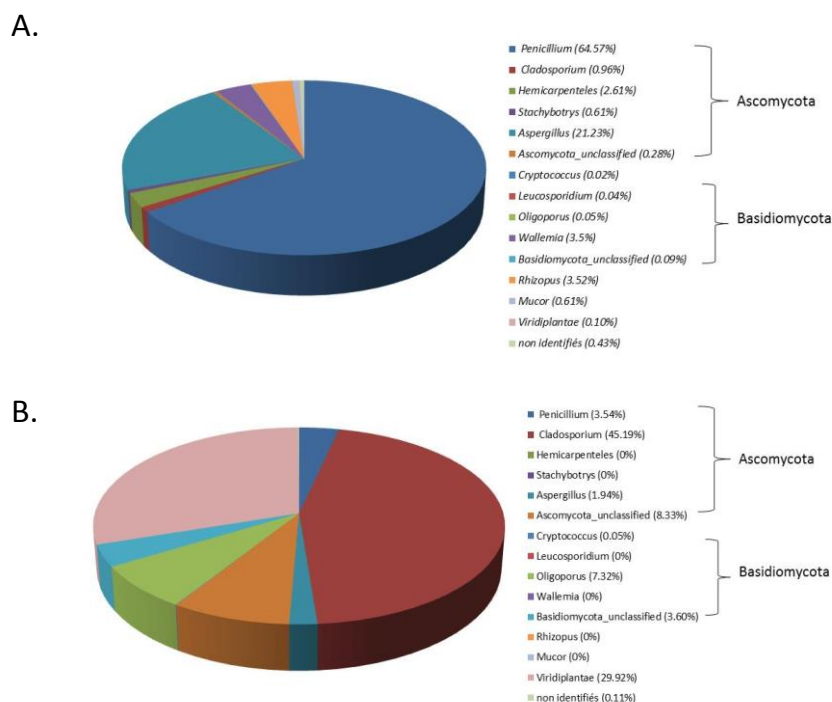


Figure 15 Fungal biodiversity at the genus rank in bioaerosols from the WSP.

Bioaerosol samples were collected A: in the Sorting Cabin and B: in the Outdoor Reference. For practical reasons, only the mean of sequencing data from SC1, SC2 and SC3 are presented.

DISCUSSION

Bacterial and fungal biodiversity in the WSP

Very few data have been published regarding the biodiversity of airborne bacterial and fungal particles in industrial plants sorting household waste. Furthermore, the available biodiversity data were obtained by culture of microorganisms followed by macroscopic and/or microscopic identification as well as biochemical identification. Thus, we have found no equivalent results in previous published studies to which our findings could be compared to.

The first analysis of NGS data indicates a higher biodiversity in samples collected in the SC as compared with the outdoor one. Furthermore, biodiversity indexes showed that bacterial biodiversity was higher than Eukaryota biodiversity. Fungal genera were more present in equi-proportion than bacterial genera.

For airborne bacteria, in a plant located in Finland where household wastes were sorted, bioaerosols were dominated by unidentified Gram-positive and Gram-negative cultivated bacteria and by bacteria belonging to *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Micrococcus* (Rahkonen, 1992). In a Danish paper sorting plant, Breum *et al.*, found that airborne cultivated bacteria were dominated by Gram-positive bacteria, including *Staphylococcus* and *Bacillus* species, and Actinomycetes (Breum *et al.*, 1999). Cultivated bacteria belonging to *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, or *Micrococcus* genera were also found in others studies carried during landfill (Breza-Boruta, 2012), glass sorting (De Vasconcelos Pinto *et al.*, 2015) and waste collection (Nielsen *et al.*, 1995; Madsen *et al.*, 2016). In

these studies, bacterial identification was usually achieved on a limited number of colonies and using Gram staining, metabolic tests, gas chromatography or mass spectrometry after cells culture. Data from previous biodiversity studies in the waste treatment sector provided similarities with our results regarding dominant bacterial taxa such as *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, and actinomycetes. They also provided differences as *Bacillus* was not found in great portion in our study as compared previous published ones. Differences found in bacterial taxa might be explained by the methods used for assessing biodiversity as well as the geographic and climatic changes in bioaerosol biodiversity (Smets *et al.*, 2016). Furthermore, due to the limits of the sequencing methods, the bacterial biodiversity could not be assessed at the species level in the study. Indeed, the DNA fragments sequenced by the Illumina technology were too short and the genetic target was too preserved to allow identification at the species level with a good accuracy. So, the NGS provided insufficient information for an accurate bacterial risk evaluation. To assess the bacterial risk, others methods such as the identification of cultured bacteria using MALDI-TOF could be used in addition with the sequencing.

For airborne fungi, findings from our study are in agreement with previous published studies for similar activities. Indeed, airborne cultivated fungi belonging to the *Penicillium* genus was found prevalent during sorting of household waste, while the *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, and *Chrysosporium* genera were also common (Breum *et al.*, 1999; Tolvanen, 2001; Tolvanen and Hänninen, 2006; Malta-Vacas *et al.*, 2012; Lehtinen *et al.*, 2013; Viegas *et al.*, 2014). *Aspergillus fumigatus* was also detected in bioaerosol samples collected in WSP by the culture method (Tolvanen 2001; Tolvanen and Hänninen, 2006) as well as by PCR (Malta-Vacas *et al.*, 2012). The genus *Penicillium* was also found to be dominant in other studies carried during out glass sorting (De Vasconcelos Pinto *et al.*, 2015) and during waste collection (Madsen *et al.*, 2016). In the latter study, the authors found 11 *Penicillium* species as *P. brevicompactum*, *P. camemberti* or *P. chrysogenum* after identification of colony using MALDI-TOF MS. They also observed 6 *Aspergillus* species including *A. nidulans*, *A. niger* and *A. versicolor*. This suggests that a substantial biodiversity can be found at the species level in bioaerosols emitted during waste collection. Such a biodiversity is expected in waste sorting plants, however, as for the bacterial biodiversity, the methods used in the present study did not allow identifying the fungal sequences at the species level.

The NGS biodiversity data from the present study revealed a far more important diversity than expected from the culture data as 112 different bacterial genera. In others studies, the authors observed from 20 bacterial genera and up to 38 bacterial species using culture-based methods (Rahkonen, 1992; Nielsen *et al.*, 1995; Breum *et al.*, 1999; De Vasconcelos Pinto *et al.*, 2015; Madsen *et al.*, 2016). The fungal diversity was more important than expected from culturing approach since 22 different genera were identified in our study versus only 2 to 8 in previous reports (Breum *et al.*, 1999; Tolvanen, 2001; Tolvanen and Hänninen, 2006; Malta-Vacas *et al.*, 2012; Lehtinen *et al.*, 2013; Viegas *et al.*, 2014). Thus, NGS provides a deeper accuracy of the types of microorganisms to which WSP workers might be exposed. To our knowledge, these results are the first report of bacterial and fungal biodiversity survey, using a metagenomics approach, published about bioaerosol emitted in waste sorting plant.

Cardboard sorting cabin vs. Outdoor

The first analysis of high-throughput sequencing data indicates a higher biodiversity in samples collected in the WSP than in the OR. The dominant bacterial genera were different in the OR

and in the SC and the composition of bioaerosols were different in the two areas whatever the taxon rank considered. Differences in biodiversity were also observed between OR and SC samples; the outdoor Eukaryota community was specifically dominated by *Cladosporium* and Plantae. Such differences were already reported regarding the fungal community (Malta-Vacas *et al.*, 2012; De Vasconcelos Pinto *et al.*, 2015). Our findings showed that WSP workers are exposed to a specific bioaerosol at their workstation.

Significance of NGS biodiversity findings

Several bacterial genera found in the present study were associated with human or animal skin, mucous membrane or intestinal tract such as, *Staphylococcus* (Schleifer and Bell 2009), *Enterococcus* (Svec and Devriese 2009) and *Streptococcus* (Whiley and Haride 2009). Bacteria from dairy milk or meat were also found such as *Lactobacillus* (Hammes and Hertel 2009), *Lactococcus* (Teuber 2009), *Leuconostoc* (Holzapfel *et al.* 2009), and *Brevibacterium* (Brennan *et al.* 2002). Bacterial biodiversity in the SC appears related to the occupational activities due to the origin of waste (domestic environment) as well as the presence of workers. This might explain the differences observed between the two sampling area.

The fungal genera found in our study include species that were associated with allergenic symptoms, opportunistic infection in immunosuppressed patients (*Aspergillus fumigatus*) or known as MVOC or mycotoxin producers (Fischer *et al.* 2000). The phylogenetic taxonomy analysis of 18S rDNA sequences allowed highlighting the occurrence of slow growing fungi belonging to the *Stachybotrys* and the *Wallemia* genera. These genera include harmful species that were almost never cited in previous works. Thus, culture based methods provide essential information, but they do not allow a global characterization of Eukaryota biodiversity. This confirms that NGS may provide a new view regarding the types of microorganisms to which WSP workers might be exposed to.

Limits and perspectives of the study

The present study was carried out with a limited number of samples and only three occupational bioaerosols and one reference were analyzed. This is not enough to draw definitive conclusion about the exposure of workers to microorganisms at the sorting plant. Indeed, due to the complexity of the bioaerosols composition and to confirm the difference between the sorting cabin and the outdoor reference, additional samples need to be collected in order to confirm these first results of biodiversity in a waste sorting plant. Data analysis showed that the Simpson's and Shannon's indexes were very close among the three replicates. Furthermore, the proportions of bacterial families found in the WSP bioaerosol appeared in the same range from a sample to another one. This suggests that the biodiversity measurement process is repeatable but additional statistical analyses are needed to comfort this. The study shows the usefulness of NGS based biodiversity measurements for occupational hygiene purposes in WSP but additional research is required to investigate more precisely the microbial composition of bioaerosols in this environment. Especially, studies are needed with more numerous bioaerosol samples collected in different WSP, at different working area in WSP and also at different moment of the year. The NGS is a qualitative method, to get a better understanding of the microbial exposure; the microbial concentration must be assessed using molecular biology methods such as qPCR or culture-based ones.

In the study, the 18S rDNA was used as target gene for the assessment of fungal biodiversity in bioaerosols. This approach reveals that Fungi were the most Eukaryota communities in the sorting

cabin. Further studies, should focus on fungal biodiversity using the ITS (internal transcribed spacer) barcode which give a better taxonomic resolution for Fungi (Schoch *et al.*, 2012).

NGS technologies have also some biases that were not addressed in our investigation. The metagenomics DNA must be of good quality to allow its sequencing. Biodiversity studied by NGS is also affected by the DNA extraction efficiency. Indeed, some microbial species can be preferably extracted depending on the DNA extraction method (Haugland *et al.*, 1999). In addition, errors were reported due to PCR biases in the sequences library preparation and to data analysis (sequences alignment). Illumina technologies provide short reads (150 pb for HiSeq and 250 pb for Miseq), these short reads are aligned with reference sequences to get a match probability. The incorrect annotation of reference sequences in the database can introduce mistakes in data analysis (Nilsson *et al.*, 2006, Yamamoto *et al.*, 2014). Because of these facts, the biodiversity, in our study, can only be assessed at the genus level (deeper assignment). But, an assessment of biodiversity at the species level is possible with an increase of the reads size using another sequencing technology as PacBio sequencing. Furthermore, a sequencing of the entire ITS region, rather than the ITS2 sequencing, can provide an accurate method to assess the fungal biodiversity at the species level (Yamamoto *et al.*, 2014). Error factors due to NGS methods are sometimes not suspected by the users or difficult to suppress. Previous studies showed that bioinformatics steps can reduce the impact of these factors. (Bellemain *et al.*, 2010; Ovaskainen *et al.*, 2010; Gihring *et al.*, 2012; van Dijk *et al.*, 2014 ; O'Rawe *et al.*, 2015). Biodiversity studied by NGS is also affected by the DNA extraction efficiency and as well as the accuracy annotation of the sequences in the data basis (Nilsson *et al.*, 2006, Yamamoto *et al.*, 2014). Nevertheless, NGS is a useful approach to describe microbial communities in occupational area, in addition to cells culture methods. To improve the biological risk evaluation, the colonies can be identified using MALDI-TOF MS for identification at the species level of the main culturable genera which has been demonstrated to provide complementary data as compared to Illumina sequencing (Madsen *et al.*, 2015). The metagenomics approach makes it possible to assess the microbial diversity as never before by removing the limits of the microbial culturability biasing the previous biodiversity studies. On the other hand, if the sequencing showed a higher biodiversity at the genus level, it did not provide any information about the bacterial or fungal species present in the bioaerosols. In further studies, an identification of microbial colony could be performed in addition to the sequencing to get information about the microbial biodiversity at the species level. The use of metagenomics made it possible to describe for the first time the biodiversity of bioaerosol in WSP overcoming such culture bias and provided a finer description of bioaerosol composition that may be inhaled by exposed WSP workers.

CONCLUSION

In the present study, the bacterial and fungal abundance in bioaerosols from a WSP treating household waste were revealed for the first time using 16S rDNA Illumina sequencing and 18S rDNA 454 pyrosequencing methods, respectively. The results showed that the components of airborne microbial communities were assigned to 4 phyla and 112 genera for bacteria and to 3 phyla and 22 genera for fungi. In the WSP, airborne bacteria were dominated by Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria with prevailing genera assigned to unclassified *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas* and *Lactobacillus*. Airborne fungi were dominated by Ascomycota with prevailing genera assigned to *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Wallemia* and *Hemicarpaceles*.

The NGS biodiversity measurements performed in the present study revealed a higher biodiversity in WSP bioaerosols than the one previously reported in studies carried out using culture methods followed by identification of microorganisms. This suggests that NGS would provide a greater accuracy than culture based methods regarding the types of microorganisms to which WSP workers might be exposed to. Furthermore, different microbial communities were found in the sorting cabin as compared with the outdoor air, which supports the hypothesis that biodiversity in bioaerosols emitted in the WSP may be specific to waste sorting activities.

The biodiversity measurement process provided repeatable results. However, further studies based on a larger number of samples and other targeted genes (ITS, genes involved in microbial pathogenicity or in the expression of allergens etc.) are needed to confirm these primary results and to investigate the uncertainty of biodiversity measurements as well as the variation of airborne microbiomes in time and in space at occupational settings.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to kindly acknowledge Catherine Coulais and Véronique Koehler for their valuable technical assistance.

REFERENCES

- Amann R, Ludwig W, Schleifer K. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*; 59:143-69.
- Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H. (2010) ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol*; 10:189-98.
- Brennan NM, Ward AC, Beresford TP, Fox PF, Goodfellow M, Cogan TM. (2002) Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Appl Environ Microb*; 68: 820-30.
- Breum NO, Würtz H, Midtgaard U, Ebbehøj N. (1999) Dustiness and bio-aerosol exposure in sorting recyclable paper. *Waste Manage Res*; 17:100-08.
- Breza-Boruta, B. (2012). Bioaerosols of the municipal waste landfill site as a source of microbiological air pollution and health hazard. *Ecol Chem Eng A*; 19: 851-62.
- Cuadros-Orellana S, Rabelo Leite L, Smith A, Dutra Medeiros J, Badotti F, Fonseca PL, Vaz AB, Oliveira G, Góes-Neto A. (2013). Assessment of fungal diversity in the environment using metagenomics: a decade in review. *Fungal Genet Biol*; 3.
- De Vasconcelos Pinto MJ, Veiga JM, Fernandes P, Ramos C, Gonçalves S, Lemos Vaz Velho MM, Guerreiro JS. (2015) Airborne microorganisms associated with packaging glass sorting facilities. *J Toxicol Env Health*; 78: 685-96.
- Douwes J, Thorne P, Pearce N, Heederik D. (2003) Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann Occ Hyg*; 47: 187-200.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*; 27: 2194-200.
- Eduard W, Heederik D, Duchaine C, Green BJ. (2012) Bioaerosol exposure assessment in the workplace: the past, present and recent advances. *J Environ Monit*; 14: 334-9.
- Fischer G, Müller T, Schwalbe R, Ostrowski R, Dott W. (2000) Exposure to airborne fungi, MVOC and mycotoxins in biowaste-handling facilities. *Int J Hyg Env Heal*; 203:97-104.
- Gihring TM, Green SJ, Schadt CW. (2012) Massively parallel rRNA gene sequencing exacerbates the potential for biased community diversity comparisons due to variable library sizes. *Environ Microbiol*; 14: 285-90.
- Gladding T, Thorn J, Stott D. (2003) Organic dust exposure and work-related effects among recycling workers. *Am J Ind Med*; 43: 584-91.
- Hammes WP, Hertel C. (2009) Volume three, the Firmicutes : Lactobacillus. In De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*: (Springer), 465-510. ISBN 978 0 387 95041 9.

- Haugland RA, Heckman JL, Wymer LJ. (1999) Evaluation of different methods for the extraction of DNA from fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. *J Microbiol Meth*; 37: 165-176.
- Hebisch R, Linsell G, (2012) Workers' exposure to hazardous substances and biological agents in recycling enterprises. *Gefahrst Reinhalt Luft*; 72: 163-69.
- Heidelberg JF, Shahamat M, Levin M, Rahman I, Stelma G, Grim C, Colwell RR. (1997) Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. *Appl Environ Microb*; 63:3585-88.
- Holzapfel WH, Bjorkroth JA, Dicks LMT. (2009) Volume three, the Firmicutes: Leuconostoc. In De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB, editors. . *Berguey's manual of systematic bacteriology*: (Springer), 624-38. ISBN 978 0 387 95041 9.
- Ivens U, Ebbehøj N, Poulsen OM, Skov T. (1997) Gastrointestinal symptoms among waste recycling workers. *Ann Agr Env Med*; 4:153-57.
- Kumari P, Choi H. (2015) Manure removal system influences the abundance and composition of airborne biotic contaminants in swine confinement buildings. *Environ Monit Assess*; 187: 1-10.
- Lehtinen J, Tolvanen O, Nivukoski U, Veijanen A, Hänninen K. (2013) Occupational hygiene in terms of volatile organic compounds (VOCs) and bioaerosols at two solid waste management plants in Finland. *Waste Manage*; 33: 964-73.
- Lin W, Yu Z, Zhang H, Thompson IP. (2014) Diversity and dynamics of microbial communities at each step of treatment plant for potable water generation. *Water Res*; 52: 218-30.
- Madsen A M, Zervas A, Tendal K, and Nielsen J L. (2015). Microbial diversity in bioaerosol samples causing ODTs compared to reference bioaerosol samples as measured using Illumina sequencing and MALDI-TOF. *Environ Res*; 140: 255-267.
- Madsen AM, Alwan T, Ørberg, A, Uhrbrand K, Jørgensen MB. (2016) Waste workers' exposure to airborne fungal and bacterial species in the truck cab and during waste collection. *Ann Occup Hyg*; 60: 651-68.
- Malta-Vacas J, Viegas S, Sabino R, Viegas C. (2012) Fungal and microbial volatile organic compounds exposure assessment in a waste sorting plant. *J Toxicol Env Health*; 75: 1410-7.
- Nielsen EM, Nielsen BH, Breum NO. (1995) Occupational bioaerosol exposure during collection of household waste. *Ann Agr Env Med*; 2: 53–59.
- Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson KH, Kõljalg U. (2006) Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLoS ONE*; 1: e59.
- O'Rawe JA, Ferson S, Lyon GJ. (2015) Accounting for uncertainty in DNA sequencing data. *Trends Genet*, 31: 61-6.
- Ovaskainen O, Nokso-Koivisto J, Hottola J, Rajala T, Pennanen T, Ali-Kovero H, Miettinen O, Oinonen P, Auvinen P, Paulin L, Larsson KH, Mäkipää R. (2010) Identifying wood-inhabiting fungi with 454 sequencing – what is the probability that BLAST gives the correct species? *Fungal Ecol*; 3: 274-83.
- Partanen P, Hultman J, Paulin L, Auvinen P, Romantschuk M. (2010) Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiol*; 10:1-11.
- Perez HR, Frank AL, Zimmerman NJ. (2006) Health effects associated with organic dust exposure during the handling of municipal solid waste. *Indoor Built Environ*; 15: 207-12.
- Rahkonen, P. (1992) Airborne contaminants at waste treatment plants. *Waste Manage Res*; 10: 411-21.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski, RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *App Environ Microb*; 75: 7537-41.
- Schlosser O, Déportes IZ, Facon B, Fromont E. (2015) Extension of the sorting instructions for household plastic packaging and changes in exposure to bioaerosols at materials recovery facilities. *Waste Manage*; 46: 47-55.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*; 109: 6241-6.
- Smets W, Moretti S, Denys S, Lebeer S. (2016) Airborne bacteria in the atmosphere: presence, purpose, and potential. *Atmospheric Environment*; 139: 214-21.
- Svec P, Devriese LA. (2009) Volume three, the Firmicutes: Enterococcus In De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB, editors. *Berguey's manual of sytematic bacteriology* (Springer), 594-606. ISBN 978 0 387 95041 9.
- Teuber M. (2009) Volume three, the Firmicutes: Lactococcus. In De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB, editors. *Berguey's manual of systematic bacteriology* (Springer), 711-22. ISBN 978 0 387 95041 9.
- Tolvanen OK. (2001) Airborne bio-aerosols and noise in a dry waste treatment plant in Pietarsaari, Finland. *Waste Manag Res*; 19: 108-14.
- Tolvanen, OK and Hanninen KI. (2006) Mechanical–biological waste treatment and the associated occupational hygiene in Finland." *Waste Manage*; 26:1119–1125.

- van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Thermes C. (2014) Library preparation methods for next-generation sequencing: tone down the bias. *Exp Cell Res*; 322: 12-20.
- Viegas C, Gomes AQ, Abegão J, Sabino R, Graça T, Viegas S. (2014) Assessment of fungal contamination in waste sorting and incineration—case study in Portugal. *J Toxicol Env Health*; 77: 57-68.
- Whiley RA, Haride JM. (2009) Volume three, the Firmicutes: Streptococcus. In De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology* (Springer), 655-710. ISBN 978 0 387 95041 9.
- Yamamoto N, Dannemiller KC, Bibby Kyle, Peccia J. (2014) Identification accuracy and diversity reproducibility associated with internal transcribed spacer-based fungal taxonomic library preparation. *Environ Microbiol*; 16: 2764-76.
- Yoo K, Lee T K, Choi E J, Yang J, Shukla S K, Hwang S-i, and J Park, (2017). Molecular approaches for the detection and monitoring of microbial communities in bioaerosols: A review. *J Environ Sci*; 51, 234-24

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Table S 1 Proportion of identified reads from bioaerosol at different taxonomic ranks in samples taken in the WSP.

Parameters	SC1	SC2	SC3	OR
<i>Proportion of identified bacterial 16S rDNA sequences^a</i>				
Total number of reads	100,895	100,2115	69,655	78,603
Phylum rank (%)	80.93	81.65	84.08	87.10
Familly rank (%)	72.85	73.04	73.59	73.76
Genus rank (%)	60.69	59.69	58.48	64.08
<i>Proportion of identified Eukaryota 18S rDNA^b sequences</i>				
Total number of reads	14,546	16,082	21,206	6,588
Phylum rank (%)	99.41	99.49	99.49	69.97
Familly rank (%)	98.63	98.65	98.96	58.03
Genus rank (%)	98.63	98.65	98.96	58.03

Bioaerosol samples were collected in the Sorting Cabin (SC) and in the Outdoor Reference (OR).^a: Illumina sequencing; ^b: 454 pyrosequencing.

Table S 2 Bacterial diversity at the family rank (proportion of 16S rDNA reads).

Phylum	Family	OR	SC1	SC2	SC3
Acidobacteria	<i>Acidobacteriaceae</i>	0.01%	0.40%	0.42%	0.16%
Actinobacteria	<i>Brevibacteriaceae</i>	0.04%	2.40%	1.63%	2.10%
	<i>Corynebacteriaceae</i>	0.12%	0.70%	0.64%	0.97%
	<i>Dermabacteraceae</i>	0.01%	0.48%	0.58%	0.61%
	<i>Geodermatophilaceae</i>	0.00%	0.21%	0.16%	0.46%
	<i>Intrasporangiaceae</i>	0.00%	0.15%	0.15%	0.11%
	<i>Kineosporiaceae</i>	0.88%	0.13%	0.09%	0.17%
	<i>Microbacteriaceae</i>	0.44%	0.50%	0.62%	0.80%
	<i>Micrococcaceae</i>	0.06%	1.90%	2.36%	1.90%
	<i>Nocardiaceae</i>	0.01%	0.10%	0.16%	0.15%
	<i>Nocardiodaceae</i>	0.01%	0.35%	0.52%	0.37%
	<i>Nocardiopepsaceae</i>	0.27%	0.15%	0.19%	0.12%
	<i>Promicromonosporaceae</i>	0.00%	0.43%	0.23%	0.14%
	<i>Propionibacteriaceae</i>	0.53%	0.07%	0.12%	0.43%
	<i>Pseudonocardiaceae</i>	0.56%	0.68%	0.54%	0.59%
	<i>Streptomyetaceae</i>	0.01%	0.42%	0.47%	0.38%
Bacteroidetes	<i>Bacteroidaceae</i>	0.00%	0.17%	0.17%	0.01%
	<i>Chitinophagaceae</i>	3.12%	0.56%	0.91%	0.22%
	<i>Cytophagaceae</i>	0.01%	0.18%	0.46%	0.82%
	<i>Flavobacteriaceae</i>	0.14%	4.93%	4.84%	3.82%
	<i>Porphyromonadaceae</i>	2.00%	0.31%	0.22%	0.86%
	<i>Prevotellaceae</i>	0.00%	0.03%	0.09%	0.10%
	<i>Sphingobacteriaceae</i>	1.22%	0.96%	1.14%	1.09%

	<i>unclassified_Bacteroidetes</i>	0.13%	0.28%	0.35%	0.86%
Chloroflexi	<i>unclassified_Chloroflexi</i>	0.01%	0.13%	0.10%	0.45%
Cyanobacteria	<i>unclassified_Cyanobacteria</i>	1.73%	1.40%	1.03%	0.96%
Deinococcus thermus	<i>Deinococcaceae</i>	0.00%	0.05%	0.30%	0.54%
Firmicutes	<i>Aerococcaceae</i>	0.03%	0.59%	0.91%	0.98%
	<i>Bacillaceae</i>	0.22%	1.80%	1.80%	2.89%
	<i>Carnobacteriaceae</i>	0.02%	0.36%	0.40%	0.25%
	<i>Clostridiaceae</i>	0.01%	0.36%	0.21%	0.00%
	<i>Enterococcaceae</i>	0.04%	1.11%	1.22%	0.63%
	<i>Erysipelotrichaceae</i>	0.01%	0.32%	0.28%	0.18%
	<i>Family_XI_Incertae_Sedis</i>	0.01%	0.15%	0.14%	0.06%
	<i>Family_XII_Incertae_Sedis</i>	0.00%	0.19%	0.12%	0.25%
	<i>Lachnospiraceae</i>	0.03%	0.91%	0.94%	0.03%
	<i>Lactobacillaceae</i>	0.06%	2.41%	2.46%	2.35%
	<i>Leuconostocaceae</i>	0.08%	3.36%	3.44%	3.99%
	<i>Listeriaceae</i>	0.01%	0.47%	0.26%	0.51%
	<i>Paenibacillaceae</i>	0.39%	0.36%	0.32%	0.62%
	<i>Planococcaceae</i>	0.13%	2.41%	1.88%	2.16%
	<i>Ruminococcaceae</i>	0.01%	0.23%	0.24%	0.78%
	<i>Staphylococcaceae</i>	0.16%	5.68%	6.08%	6.89%
	<i>Streptococcaceae</i>	0.06%	2.96%	2.47%	2.83%
	<i>Thermoactinomyces</i>	0.00%	0.10%	0.13%	0.33%
	<i>unclassified_Firmicutes</i>	4.98%	3.63%	3.97%	4.30%
Planctomycetes	<i>Planctomycetaceae</i>	2.40%	0.01%	0.52%	1.02%
Proteobacteria	<i>Acetobacteraceae</i>	0.04%	0.84%	0.97%	1.65%
	<i>Aeromonadaceae</i>	0.01%	0.44%	0.14%	0.10%
	<i>Alcaligenaceae</i>	0.02%	0.53%	0.74%	0.64%
	<i>Alcaligenes</i>	0.01%	0.05%	0.23%	0.00%
	<i>Bradyrhizobiaceae</i>	5.76%	0.17%	0.36%	0.24%
	<i>Brucellaceae</i>	0.58%	0.08%	0.04%	0.10%
	<i>Burkholderiaceae</i>	21.52%	0.73%	0.90%	0.83%
	<i>Caulobacteraceae</i>	4.36%	0.73%	1.00%	1.14%
	<i>Comamonadaceae</i>	5.07%	0.96%	0.74%	0.91%
	<i>Enterobacteriaceae</i>	0.32%	9.88%	9.83%	8.32%
	<i>Halomonadaceae</i>	0.01%	0.05%	0.15%	0.20%
	<i>Hyphomicrobiaceae</i>	0.01%	0.24%	0.25%	0.35%
	<i>Methylobacteriaceae</i>	0.01%	0.20%	0.26%	0.48%
	<i>Moraxellaceae</i>	10.06%	5.82%	5.22%	4.70%
	<i>Nitrosomonadaceae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
	<i>Oxalobacteraceae</i>	0.08%	0.95%	1.23%	1.02%
	<i>Phyllobacteriaceae</i>	3.91%	0.31%	0.32%	0.10%
	<i>Pseudomonadaceae</i>	0.97%	4.68%	5.34%	4.62%
	<i>Rhodobacteraceae</i>	0.06%	1.23%	1.13%	0.59%

	<i>Rhodospirillaceae</i>	0.00%	0.20%	0.03%	0.00%
	<i>Sinobacteraceae</i>	0.00%	0.02%	0.10%	0.00%
	<i>Sphingomonadaceae</i>	0.46%	0.57%	0.48%	1.00%
	<i>unclassified_Proteobacteria</i>	6.34%	1.69%	1.79%	2.60%
	<i>Vibrionaceae</i>	0.01%	0.32%	0.23%	0.26%
	<i>Xanthomonadaceae</i>	8.10%	3.33%	2.50%	2.04%

Table S 3 Bacterial diversity at the genus rank (proportion of 16S rDNA reads)

Phylum	Genus	OR	SC1	SC2	SC3	Mean SC
Actinobacteria	<i>uncultured_Acidobacteriaceae</i>	0.01%	0.27%	0.21%	0.16%	0.22%
	<i>Brevibacterium</i>	0.04%	2.39%	1.63%	2.10%	2.04%
	<i>Corynebacterium</i>	0.12%	0.69%	0.64%	0.97%	0.77%
	<i>Brachybacterium</i>	0.01%	0.48%	0.58%	0.58%	0.55%
	<i>unclassified_Intrasporangiaceae</i>	0.00%	0.05%	0.07%	0.08%	0.07%
	<i>unclassified_Kineosporiaceae</i>	0.88%	0.12%	0.08%	0.11%	0.11%
	<i>unclassified_Microbacteriaceae</i>	0.44%	0.50%	0.61%	0.80%	0.63%
	<i>Kocuria</i>	0.02%	0.31%	0.51%	0.37%	0.40%
	<i>unclassified_Micrococcaceae</i>	0.05%	1.55%	1.77%	1.48%	1.60%
	<i>unclassified_Nocardiaceae</i>	0.00%	0.01%	0.01%	0.01%	0.01%
	<i>Nocardiopsis</i>	0.27%	0.14%	0.18%	0.11%	0.14%
	<i>unclassified_Promicromonosporaceae</i>	0.00%	0.43%	0.23%	0.14%	0.26%
	<i>Propionibacterium</i>	0.53%	0.03%	0.03%	0.27%	0.11%
	<i>unclassified_Pseudonocardiaceae</i>	0.56%	0.44%	0.33%	0.49%	0.42%
	<i>Streptomyces</i>	0.00%	0.20%	0.14%	0.23%	0.19%
	<i>unclassified_Streptomycetaceae</i>	0.01%	0.22%	0.33%	0.16%	0.24%
Bacteroidetes	<i>Bacteroides</i>	0.00%	0.17%	0.17%	0.01%	0.12%
	<i>Sediminibacterium</i>	3.09%	0.01%	0.12%	0.01%	0.05%
	<i>unclassified_Chitinophagaceae</i>	0.01%	0.09%	0.43%	0.19%	0.24%
	<i>uncultured_Chitinophagaceae</i>	0.03%	0.46%	0.35%	0.02%	0.27%
	<i>Dyadobacter</i>	0.00%	0.02%	0.04%	0.19%	0.08%
	<i>Hymenobacter</i>	0.01%	0.11%	0.23%	0.55%	0.30%
	<i>Spirosoma</i>	0.00%	0.00%	0.10%	0.00%	0.04%
	<i>Chryseobacterium</i>	0.02%	1.28%	0.59%	0.31%	0.73%
	<i>Cloacibacterium</i>	0.00%	0.05%	0.02%	0.13%	0.07%
	<i>Empedobacter</i>	0.00%	0.16%	0.13%	0.01%	0.10%
	<i>Flavobacterium</i>	0.00%	0.30%	0.52%	0.46%	0.43%
	<i>Myroides</i>	0.04%	1.14%	1.28%	0.27%	0.90%
	<i>unclassified_Flavobacteriaceae</i>	0.07%	1.46%	1.59%	2.62%	1.89%
	<i>Wautersiella</i>	0.01%	0.25%	0.40%	0.01%	0.22%
	<i>Dysgonomonas</i>	0.00%	0.25%	0.21%	0.33%	0.26%
	<i>unclassified_Porphyromonadaceae</i>	2.00%	0.03%	0.01%	0.53%	0.19%
	<i>unclassified_Prevotellaceae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
	<i>Pedobacter</i>	0.01%	0.21%	0.32%	0.20%	0.24%

	<i>Sphingobacterium</i>	0.02%	0.41%	0.59%	0.35%	0.45%
	<i>unclassified_Sphingobacteriaceae</i>	1.20%	0.34%	0.23%	0.46%	0.34%
Deinococcus thermus	<i>unclassified_Deinococcaceae</i>	0.00%	0.05%	0.30%	0.54%	0.30%
Firmicutes	<i>Aerococcus</i>	0.02%	0.53%	0.90%	0.90%	0.78%
	<i>unclassified_Aerococcaceae</i>	0.00%	0.03%	0.01%	0.00%	0.01%
	<i>Bacillus</i>	0.00%	0.13%	0.31%	0.22%	0.22%
	<i>unclassified_Bacillaceae</i>	0.04%	1.46%	1.31%	2.60%	1.79%
	<i>Carnobacterium</i>	0.00%	0.18%	0.21%	0.24%	0.21%
	<i>Desemzia</i>	0.01%	0.16%	0.17%	0.01%	0.11%
	<i>Clostridium</i>	0.01%	0.30%	0.14%	0.00%	0.15%
	<i>Enterococcus</i>	0.04%	1.08%	1.22%	0.63%	0.98%
	<i>Catenibacterium</i>	0.00%	0.06%	0.03%	0.11%	0.07%
	<i>Tissierella</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
	<i>unclassified_Family_XI_Incertae_Sedis</i>	0.00%	0.08%	0.09%	0.06%	0.07%
	<i>Exiguobacterium</i>	0.00%	0.19%	0.12%	0.25%	0.19%
	<i>Incertae_Sedis</i>	0.02%	0.35%	0.37%	0.01%	0.24%
	<i>unclassified_Lachnospiraceae</i>	0.01%	0.55%	0.43%	0.02%	0.33%
	<i>Lactobacillus</i>	0.06%	2.29%	2.29%	2.24%	2.27%
	<i>unclassified_Lactobacillaceae</i>	0.01%	0.07%	0.16%	0.03%	0.09%
	<i>Leuconostoc</i>	0.06%	2.77%	2.99%	3.45%	3.07%
	<i>Weissella</i>	0.02%	0.45%	0.36%	0.40%	0.40%
	<i>Brochothrix</i>	0.01%	0.47%	0.26%	0.51%	0.41%
	<i>Paenibacillus</i>	0.38%	0.25%	0.19%	0.32%	0.25%
	<i>unclassified_Planococcaceae</i>	0.13%	2.41%	1.88%	2.16%	2.15%
	<i>Incertae_Sedis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
	<i>unclassified_Ruminococcaceae</i>	0.01%	0.18%	0.09%	0.73%	0.33%
	<i>Jeotgalicoccus</i>	0.01%	0.23%	0.25%	0.31%	0.27%
	<i>Staphylococcus</i>	0.14%	5.12%	5.40%	6.36%	5.63%
	<i>unclassified_Staphylococcaceae</i>	0.01%	0.31%	0.34%	0.21%	0.29%
	<i>Lactococcus</i>	0.03%	1.86%	1.54%	2.18%	1.86%
	<i>Streptococcus</i>	0.04%	1.10%	0.93%	0.65%	0.89%
	<i>Thermoactinomyces</i>	0.00%	0.04%	0.09%	0.22%	0.12%
Planctomycetes	<i>Singulisphaera</i>	2.39%	0.00%	0.08%	0.17%	0.08%
Proteobacteria	<i>Acetobacter</i>	0.01%	0.28%	0.35%	0.32%	0.32%
	<i>Acidocella</i>	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	0.01%
	<i>Gluconobacter</i>	0.01%	0.25%	0.07%	0.22%	0.18%
	<i>unclassified_Acetobacteraceae</i>	0.01%	0.19%	0.33%	0.61%	0.38%
	<i>uncultured_Acetobacteraceae</i>	0.01%	0.10%	0.17%	0.42%	0.23%
	<i>Aeromonas</i>	0.01%	0.44%	0.14%	0.10%	0.23%
	<i>unclassified_Alcaligenaceae</i>	0.01%	0.18%	0.27%	0.27%	0.24%
	<i>Achromobacter</i>	0.01%	0.06%	0.13%	0.17%	0.12%
	<i>Bradyrhizobium</i>	5.75%	0.17%	0.23%	0.17%	0.19%
	<i>unclassified_Bradyrhizobiaceae</i>	0.01%	0.00%	0.09%	0.00%	0.03%

<i>uncultured_Bradyrhizobiaceae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.08%	0.03%
<i>Ochrobactrum</i>	0.58%	0.06%	0.02%	0.00%	0.03%
<i>Burkholderia</i>	0.02%	0.07%	0.04%	0.01%	0.04%
<i>Ralstonia</i>	21.50%	0.66%	0.85%	0.83%	0.78%
<i>Brevundimonas</i>	0.01%	0.46%	0.52%	0.35%	0.44%
<i>unclassified_Caulobacteraceae</i>	0.01%	0.09%	0.13%	0.36%	0.19%
<i>uncultured_Caulobacteraceae</i>	4.34%	0.11%	0.34%	0.42%	0.29%
<i>Comamonas</i>	0.00%	0.25%	0.10%	0.01%	0.12%
<i>Schlegelella</i>	1.57%	0.00%	0.02%	0.01%	0.01%
<i>unclassified_Comamonadaceae</i>	3.50%	0.70%	0.61%	0.88%	0.73%
<i>Proteus</i>	0.02%	0.50%	0.52%	0.59%	0.54%
<i>Providencia</i>	0.02%	0.40%	0.42%	0.32%	0.38%
<i>unclassified_Enterobacteriaceae</i>	0.27%	8.90%	8.85%	7.39%	8.38%
<i>Halomonas</i>	0.00%	0.03%	0.13%	0.20%	0.12%
<i>Methylobacterium</i>	0.01%	0.14%	0.19%	0.36%	0.23%
<i>Acinetobacter</i>	10.03%	5.22%	4.58%	3.63%	4.48%
<i>Enhydrobacter</i>	0.01%	0.07%	0.07%	0.01%	0.05%
<i>Psychrobacter</i>	0.02%	0.43%	0.35%	0.79%	0.52%
<i>unclassified_Moraxellaceae</i>	0.01%	0.10%	0.21%	0.27%	0.19%
<i>uncultured_Nitrosomonadaceae</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<i>Massilia</i>	0.05%	0.63%	0.88%	0.71%	0.74%
<i>unclassified_Oxalobacteraceae</i>	0.02%	0.23%	0.26%	0.29%	0.26%
<i>Mesorhizobium</i>	0.00%	0.01%	0.06%	0.00%	0.02%
<i>unclassified_Phyllobacteriaceae</i>	3.90%	0.30%	0.26%	0.09%	0.22%
<i>Pseudomonas</i>	0.91%	2.63%	3.30%	3.03%	2.99%
<i>unclassified_Pseudomonadaceae</i>	0.06%	1.98%	2.00%	1.58%	1.85%
<i>unclassified_Rhodobacteraceae</i>	0.05%	1.02%	0.99%	0.47%	0.83%
<i>Skermanella</i>	0.00%	0.16%	0.03%	0.00%	0.07%
<i>uncultured_Sinobacteraceae</i>	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	0.01%
<i>Sphingobium</i>	0.00%	0.02%	0.06%	0.02%	0.03%
<i>Sphingomonas</i>	0.45%	0.16%	0.24%	0.65%	0.35%
<i>Ignatzschineria</i>	0.03%	0.58%	0.80%	0.57%	0.65%
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0.00%	0.08%	0.05%	0.00%	0.04%
<i>Stenotrophomonas</i>	0.35%	2.34%	1.32%	0.88%	1.52%
<i>unclassified_Xanthomonadaceae</i>	7.71%	0.24%	0.27%	0.20%	0.24%

Partie 3

Développement métrologique
du processus d'analyse de la
biodiversité sur des
bioaérosols générés en
laboratoire

Partie 3: développement métrologique du processus d'analyse de la biodiversité sur des bioaérosols générés en laboratoire

1. Résumé

Il existe une grande diversité de paramètres permettant l'analyse de la biodiversité microbienne par une approche utilisant la biologie moléculaire: méthodes d'extraction d'ADN, cible de séquençage ou outils bio-informatique pour l'analyse des séquences. Le choix de ces outils peut avoir un impact sur les résultats de biodiversité. L'objectif de cet article était d'étudier différents facteurs pouvant influencer les analyses de métagénomique pour l'étude des bioaérosols fongiques et de comparer cette approche avec les méthodes traditionnelles de culture.

Pour cela, des bioaérosols ont été générés en laboratoire à partir d'une suspension liquide composée de quatre souches de moisissures : *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium brevicompactum* et *Wallemia melicolla*. Les bioaérosols ont ensuite été générés par bullage dans un banc de génération présent au laboratoire (Simon *et al.*, 2011). Les moisissures ainsi aérosolisées ont été prélevées par filtration sur un filtre en polycarbonate (diamètre de pore de 0,8 µm) dans une cassette fermée de 37 mm de diamètre avec un débit de 2 L.min⁻¹ pendant 60 min. Trois cassettes ont été prélevées par bioaérosols générés et ce pendant trois jours consécutifs, une nouvelle suspension liquide étant préparée pour chaque génération. Les paramètres physiques du bioaérosol généré ont été étudiés et contrôlés pour garantir une standardisation des conditions de génération et du bioaérosol produit. Les particules ont été éluées du filtre par ajout d'une solution aqueuse contenant 0,01 % de Tween 80 puis l'ADN a été extrait suivant deux kits commerciaux : FastDNA®SPIN kit for soil (MP Biomedicals, USA) et PowerSoil® DNA isolation kit (MOBio, USA). Pour étudier l'impact de la cible génétique sur les résultats de biodiversité, l'ADNr 18S et la région ITS2 ont été séquencées par la plateforme Miseq de Illumina par un prestataire extérieur (INRA Transfert, France) qui ont également procédé au nettoyage des séquences. L'assignation des séquences d'ADNr 18S a été réalisée par utilisation de l'algorithme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) et de la base de données Genbank de NCBI. Les séquences ITS2 ont été assignées par deux méthodes : assignation en utilisant l'algorithme BLAST et la base de données UNITE; une méthode dite méthode de Wang qui est exécutée avec le logiciel Mothur comparant les séquences avec la même base de données que précédemment. La composition fongique a également été déterminée après culture des particules éluées sur milieu MEA (Malt Agar Extract). Les colonies ayant des profils macroscopiques très différents, leur identification s'est faite uniquement sur ce critère.

La distribution granulométrique des bioaérosols était identique pour les trois générations avec un diamètre aérodynamique médian en nombre de 2,95 µm. Les différentes approches ont permis de détecter les quatre souches fongiques. La composition similaire entre les suspensions liquides et les bioaérosols a suggéré une absence de biais lors de l'aérosolisation des souches fongiques. Le protocole de génération est apparu comme répétable, reproductible et robuste. Les résultats de biodiversité fongique, obtenus avec différentes méthodes, ont donc pu être comparés. La meilleure

efficacité d'extraction d'ADN a été obtenue avec le kit commercialisé par MP Biomedicals. Le kit de MOBio n'a pas permis d'extraire suffisamment d'ADN pour permettre le séquençage ($<3 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Ceci a démontré l'importance du choix de la méthode d'extraction d'ADN pour les études de biodiversité caractérisée par les techniques de biologie moléculaire. Parmi les quatre souches fongiques, seulement trois ont été observées par culture. En effet, *Wallemia mellicola* qui est un champignon xérophilique, a eu une croissance plus lente que les autres souches sur le milieu MEA. Par ailleurs, elle forme de petites colonies (1-2 mm de diamètre) la rendant difficilement décelable à l'œil nu en présence de moisissures avec une cinétique de croissance plus rapide et des colonies de taille plus importante. Néanmoins, *Wallemia* était la moisissure majoritaire par séquençage à haut débit, représentant 60% des lectures (reads) quel que soit la cible de séquençage ou la méthode d'assignation des séquences. *Aspergillus niger* a été observé en proportion importante (25%) par culture mais a été détecté en très faible proportion par séquençage (0,10%). Les données de séquençage ont mis en évidence la présence d'organismes qui n'avaient pas été ajoutés à la suspension liquide comme des séquences assignées à des plantes, protozoaires (pour l'ADNr 18S) ou d'autres champignons (ADNr 18S ou ITS2). Ces organismes sont présents en très faible abondance dans les bioaérosols et absents dans les suspensions liquides ce qui suggèrent une contamination des dispositifs de génération ou d'erreur lors du séquençage ou d'assignation. Néanmoins, aux incertitudes de mesure près, la composition fongique était similaire dans les bioaérosols et dans les suspensions liquides.

Les résultats de biodiversité dépendent de la méthode utilisée pour la caractériser. La culture et le séquençage haut débit sont apparus comme des techniques complémentaires. En ce qui concerne les analyses par séquençage à haut débit, l'étape d'extraction d'ADN est une étape limitante. La région ITS2 était plus appropriée que l'ADNr 18S pour étudier la biodiversité fongique. Pour les études ultérieures ayant pour objectif de caractériser la biodiversité fongique par séquençage à haut débit, la région ITS2 sera séquencée et les séquences obtenues seront assignées par BLAST avec la base de données UNITE.

2. Article 2: Use of a fungal bioaerosol consortium to assess analytical biases in biodiversity measurements

Jodelle Degois¹, Xavier Simon¹, Cyril Bontemps², Pierre Leblond², Philippe Duquenne¹

¹Department of pollutant metrology, Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), Vandoeuvre-lès-Nancy 54500, France; ²Université de Lorraine, Institut National de la Recherche Agronomique, Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne (DynAMic), UMR INRA 1128, Nancy 54000, France

Keywords: bioaerosol, moulds, biodiversity

Article en voie de soumission (AST)

ABSTRACT

The biodiversity in bioaerosols is an important issue to investigate for a better understanding of occupational risks due to exposure to airborne particles. The traditional methods used to study the biodiversity are based on culture followed by an identification of the colonies by morphological identification, molecular biology or biochemical techniques. The culture step represents the main limit of this approach. The aim of the present study was to test a metagenomic approach to assess fungal biodiversity in bioaerosols and to characterize some of the analytic bias on biodiversity results. Complex fungal bioaerosol containing four fungal strains (*Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium brevicompactum* and *Wallemia melicolla*) were laboratory generated using a bubbling aerosolizer. The biodiversity was assessed by culture or sequencing, the DNA extraction was performed using two kits. Two genetic targets were sequenced and two assignment methods were compared. Only one kit provided enough DNA amount needed for the sequencing. *Wallemia* was detected only by the NGS whereas *Aspergillus* was observed, in subsequent proportion, only by culture method. The proportions in the liquid suspensions and in the generated bioaerosols were nearly the same. The sequencing of the ITS2 region provided closer composition as the theoretical composition than the 18S rDNA. The study shows that results from biodiversity investigations are strongly depending on the analysis method used. Further studies are required to evaluate the impact of these findings when considering biodiversity in complex and unknown environments.

INTRODUCTION

Exposure to fungal bioaerosols has been demonstrated in many workplaces and was associated to several health disorders, particularly respiratory tract ones including allergy (asthma, rhinitis or hypersensitivity pneumonitis), irritation and infection (Douwes *et al.*, 2003; Fung and Hughson 2003). The biodiversity of fungal aerosols has been investigated in several working sectors revealing their complex and variable composition (Bru-Adan *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2015; Kristiansen *et al.*, 2012; Tolvanen, 2001). As a consequence, the specific microbial agents responsible for health disorders are not totally known and their precise role in symptoms poorly understood (Dyląg 2017). This probably explains the lack of dose-response relationships for most of non-infectious airborne

microorganisms and the unavailability of occupational exposure limit values for airborne fungi (Douwes *et al.*, 2003; Fung and Hughson 2003). Thus, biodiversity in bioaerosols is an important issue to investigate for a better understanding of occupational risks due to exposure to airborne biological particles.

The methods used for studying biodiversity are diversified and include culture-dependant methods with morphological, microscopic and biochemical identification, as well as molecular methods such as high-throughput sequencing (NGS). All these methods have specific advantages and limits that were reviewed (Yoo *et al.* 2017; Duquenne, 2018). Culture-based methods are known to underestimate the actual biodiversity in environmental samples mainly due to the viable but non-culturable state of most of microorganisms as well as the selective pressure of culture conditions (Yoo *et al.* 2017). On other hand, molecular-based methods such as NGS, that avoid the culture step, consist of several analytical steps (DNA extraction, library preparation, sequencing and bioinformatics analysis) which may be a source of biases. For example, species may be favorably detected due to the preferably extraction DNA from cells (Haugland *et al.* 1999) or to the easiest DNA amplification of some fungi due the primers used for the library preparation (Bellemain *et al.* 2010). Different bioinformatics tools are available for the sequencing data analysis such as Mothur (Schloss *et al.*, 2009), QIME (Caporaso *et al.*, 2010), FHiTINGS (Dannemiller *et al.*, 2014). The assignment of the sequences may also be done using different methods or databases that may lead to differences in biodiversity results.

Thus, biases in biodiversity methods were identified but their respective impact on biodiversity results remain to be clarified for bioaerosols. A relevant investigation of methods for the assessment of microbial composition of bioaerosols requires the use of bioaerosols of known and mastered composition. Most published studies dealing with biodiversity in bioaerosols were carried out in real exposure conditions (Yoo *et al.*, 2017). As the actual composition of such field bioaerosol is not known, comparative studies of biodiversity methods may be difficult to interpret.

In the present study, a reproducible fungal bioaerosol of known and mastered composition was generated and characterize in order to investigate the impact of different analytical procedures on biodiversity results. The investigated analytical procedures were 1) the biodiversity analysis method (culture vs. NGS); 2) the DNA extraction kit; 3) the target gene for sequencing; 4) the method used for sequences assignation on results from biodiversity measurements of fungal bioaerosols generated in laboratory.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of fungal suspensions and consortia

Four fungal suspensions were prepared with different strains: *Aspergillus niger* (ATCC 11431.83, CRBIP, France), *Penicillium brevicompactum* (UMIP 2338.96, CRBIP, France), *Cladosporium cladosporioides* (ATCC 16022, LGC standard, France) and *Wallemia melicolla* (firstly identified as *Wallemia sebi* by the manufacturer) (ATCC 42649, LGC standard, France). Each strain was sub-cultured on malt extract agar (MEA) medium (BD Difco™ Malt Agar) for 7 days at 25°C. Then, the agar surfaces were scraped and the fungal entities were transferred into 10 mL sterile water. This preparation was filtered on a glass frit of porosity 2 (40-100 µm, Duran). The frit was then cleaned with sterile water to obtain a final volume of 25 mL. Two subsequent centrifugations at 5100 g for 7 min were performed to remove medium and impurities. The pellets were resuspended in 25 mL sterile pure water. The optical density at 600 nm was adjusted at 1.3 which corresponded to a

culturable fungi concentration about 1×10^6 CFU.m⁻³. To prepare the fungal consortium, 20 mL of each spore suspension were mixed.

Description of the setup for bioaerosol generation, characterization and sampling

The test rig includes a bubbling-type generator and a chamber to condition and sample bioaerosols (Figure 16). This setup has been previously described (Simon *et al.* 2011). Briefly, a peristaltic pump feeds the liquid culture onto the upper surface of a 2-mm thick stainless steel porous disc (Stemm, 30 mm in diameter, 1 µm pore diameter), which settles as a liquid film. A dispersion cell is used to produce a constant, reproducible liquid film height ($H_{liq} = 8$ mm) throughout a test and between tests. Fungal particles are dispersed by bubbling compressed air (flow rate $5 \leq Q_G \leq 10$ L.min⁻¹) through the film of liquid culture. Transport of the aerosolised particles towards the generator outlet is improved by an upward injection of entraining air (flow rate $13 \leq Q_E \leq 18$ L.min⁻¹), which is composed of a mixture of dry and humid air in adjustable proportions to ensure a constant relative humidity (RH = 50 ± 1.5 % - thermo-hygrometer Rotronic®, HygroPalm2) throughout the assay. Temperature and relative humidity are continuously measured; the thermo-hygrometer probe (Rotronic®, HygroClip®). Depending on the day of generation, the 60-min averaged values of air temperature were comprised between 21.5 and 25 °C. The compressed air is first dried and filtered in a treatment unit (TSI™, model 3074B); airflow rates are adjusted using regulated thermal mass flow metres (Brooks®, models 5850S) and a mass flow metres' read-out and control unit (Brooks®, model 0154 – 0.1 L.min⁻¹ accuracy).

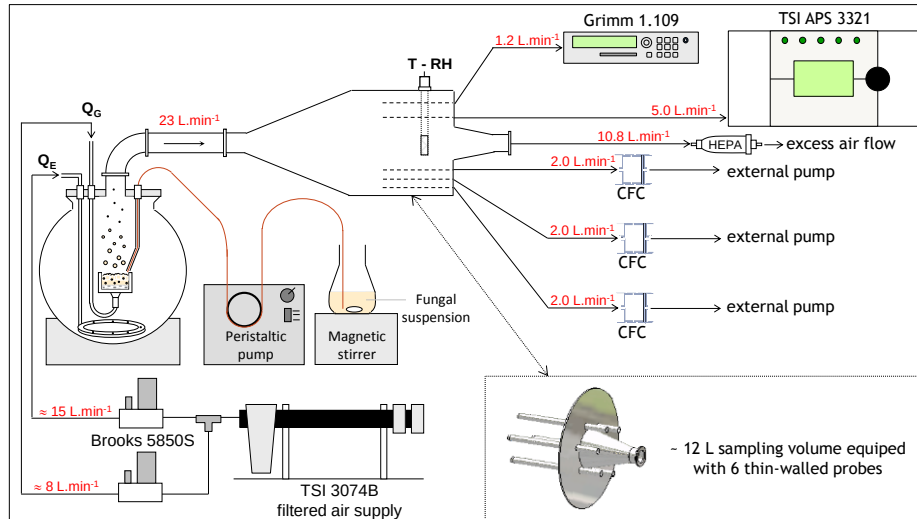


Figure 16 Diagram of the test rig used to generate and sample the experimental bioaerosols. (Q_G = bubbling airflow; Q_E = entraining airflow; T = temperature of air; RH = relative humidity of air; CFC = closed-face cassette)

The test rig is completed by a 12-L sampling chamber where the bioaerosol is conditioned and sampled. This chamber is equipped with six 20 cm long, 10 mm i.d. sampling probes, for simultaneous connection of devices (real-time instruments, samplers, etc.).

Each generated bioaerosol was simultaneously sampled by three closed-face cassettes (Millipore®, 37-mm polystyrene 3-piece closed face cassette - CFC) connected to the sampling chamber. A cassette contained a support pad (Millipore®, thick cellulose absorbent pad) and a filter (Whatman®,

Nuclepore[®] polycarbonate membrane, 0.8µm pore size). Sampling was performed at a flow rate of 2 L.min⁻¹ with a personal sampling pump (Gilian[®], GilAir-3) during 60 min.

An optical particle counter (OPC-Grimm[®], G1109) was used for real-time monitoring of the particle number concentration. The OPC-Grimm[®] works at a sampling airflow of 1.2 L.min⁻¹ and classes particles according to their size (optical diameter, d_{opt}) between 0.25 and 32 µm, across 31 channels; particle counting was integrated over 6 s. We assumed that particles with an optical diameter greater than 1 µm are fungal entities (spores, mycelium fragments, agglomerates of spores, strands of mycelium), whether they are culturable, non-culturable or dead. The cumulated particle number concentration with an optical diameter greater than 1 µm, $C_N(d_{opt} > 1 \mu m)$, was considered as an indicator of the total fungal concentration in the generated bioaerosol. All experiments were performed using a target value for $C_N(d_{opt} > 1 \mu m)$ as close as possible to 7,000 #.L⁻¹ (upper limit considering the particle concentration in the liquid cultures). Section S1 in the online supplemental information (SI) contains more information.

The size distribution of the generated particles was also assessed with an Aerodynamic Particle Sizer[®] (APS-TSI™, model 3321). The APS spectrometer measures the aerodynamic diameter (d_{ae}) in real-time for particles from 0.5 to 20 µm, using 52 channels and a sampling flow rate of 5 L.min⁻¹; particle counting was integrated over 120 s. 60-min averaged number size distribution was used to adjust a log-normal distribution (least squares optimization) and to determine the median aerodynamic diameter ($\overline{d_{ae}}$), and the associated geometric standard deviation (σ_g).

Elution of fungal particles collected on filters

At the end of the sampling, a volume of 10 mL of a sterile solution (0.01 % Tween 80 in ultra-pure water) was introduced into the cassettes by the inlet. The cassette inlets and outlets were closed with a cap and placed on a rocker (Heidolph[®], Multi-Reax shaker) at 2000 rpm for 20 min and at room temperature.

Enumeration and identification of culturable fungi

Culturable fungi concentration and biodiversity were assessed in bioaerosol samples, consortia suspensions and pure-culture samples. Three successive dilutions were spread in Petri dishes containing MEA medium (Duquenne *et al.*, 2012). During 5 days of incubation at 25°C, fungal colonies were counted on each Petri dish. The culturable fungi concentrations were expressed as Colony Forming Unit per milliliter of liquid analysed (CFU.mL⁻¹) in the suspensions and as CFU per cubic meter of sampling air (CFU.m⁻³) in the CFC. In the liquid consortia and bioaerosol consortia, each colony was identified at the genus level by macroscopic morphology.

DNA extraction

DNA extraction was performed with 500 µL of each bioaerosol consortia and liquid consortia. To compare DNA extraction efficiency and the impact on biodiversity analysis, two DNA extraction kits were used: the PowerSoil[®] DNA isolation kit (MOBio, USA) and the FastDNA[®]SPIN kit for soil (MPBio, USA); in three repetitions per sample and per kit; according to the manufacturer's instructions. The DNA samples were stored at -20°C until analysis. The DNA concentration was measured using Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, Illkirch, France).

Observed concentration mean was $6.7 \pm 1.9 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ for the MPBio kit and $1.4 \pm 1.1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ for the MOBio kit.

qPCR

To compare the DNA extraction efficiency, the DNA concentrations were assessed by qPCR. The DNA amplification was performed using the primers nu-SSU-0817-59 (TTAGCATGGAATAATRAATAGGA) and nu-SSU-1196-39 (TCTGGACCTGGTGAGTTTCC) developed by Borneman and Martin (2000). Each qPCR mixture consisted of 400 nM of each primers, 12.5 μL of mix (iQ™ SYBR® Green Spermix, Bio Rad,) and 5 μL DNA templates in a reaction volume of 25 μL . After a first denaturation at 95°C for 15 min, forty cycles of PCR were then performed by using 94°C for 15 s, 52°C for 30 s, and 72°C for 45s. The DNA concentration was expressed in number to achieve the C_T (Cycle threshold).

Sequencing and data analysis

One bioaerosol consortium per generation (one CFC per day, three in total) was randomly selected for the sequencing. Each suspension consortium was also sequenced. Two genetic barcodes were sequenced to evaluate the impact of the genetic barcode on fungal biodiversity analysis. DNA purification, amplification and sequencing were performed by INRA Transfert Environnement (Narbonne, France). The universal primers used for Eukaryota DNA amplification were w553 CTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGCGGTAA TTCCAGCTCCAA and w554 GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGGCAAAT GCTTTCGC, targeting the V1 variable region of Eukaryota 18S rDNA. The primers used to amplify the specific fungal barcode ITS2 were w404 CTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGTGARTCATCGAATCTTTG and w40 GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCCTCCGCTTATTGATATGC. Each PCR mixture consisted of: 5 μL of DNA template, 4 μL of dNTPs (25 mM), 1 μL of each primer ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), and 0.5 μL of Taq polymerase in a total volume of 50 μL . The PCR temperature cycle was 95°C for 2 min, 56°C for 1 min and 72°C for 1 min. The two genetic targets were sequenced using MiSeq technology (Illumina, San Diego, USA). The preprocessing of sequence analysis was performed using a Mothur pipeline version 1.37.4 (Schloss *et al.*, 2009) developed by INRA Transfert Environnement. After trimming and denoising, barcodes, primers and homopolymers longer than 8 pb were removed. Chimera were detected and deleted using UNCHIME (Edgar, Haas *et al.* 2011) executed in Mothur. Reads with 100 per cent of identity were clustered into a unique sequence. Then, the 18S unique sequences were assigned at the genus rank (E value min: 10^{-100}) using BLASTn algorithm in Genbank (NCBI database; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). To assess the impact of data analysis step, the ITS2 unique sequences were assigned by two ways: 1. massBLASTER algorithm against UNITE database (<https://unite.ut.ee/analysis.php>), 2. Wang method executed in Mothur against UNITE database.

RESULTS

Size distribution of airborne fungal particles

The experimental design allowed the generation of bioaerosols from the 4-strains consortium mixing liquid culture and an example of the size distribution of airborne particles as a function of their aerodynamic diameter is shown in Figure 17. The main population had a CMAD

(count median aerodynamic diameter) of 2.95 μm , with a geometric standard deviation of 1.16. Airborne experimental particles presented aerodynamic diameters between around 1.7 and 6.0 μm . A second population of particles with a diameter less than about 1.7 μm is also visible on Figure 17. The size distributions of the 4-strains mixing experimental bioaerosol were almost identical for the three independent generation runs that were carried out (Figure S2).

The size distribution of bioaerosols generated from a pure culture of each individual fungal strain was also investigated. The population of *Wallemia melicolla* spores had a CMAD of 2.45 μm , with a geometric standard deviation of 1.11 (Figure S3). As well as *Penicillium brevicompactum*, *Wallemia melicolla* particles presented aerodynamic diameters between around 1.7 and 5.0 μm . *Aspergillus niger* and *Cladosporium cladosporioides* presented CMADs slightly higher: 3.45 (mainly between 2.5 and 6.0) and 2.75 (mainly between 1.7 and 7.0), respectively.

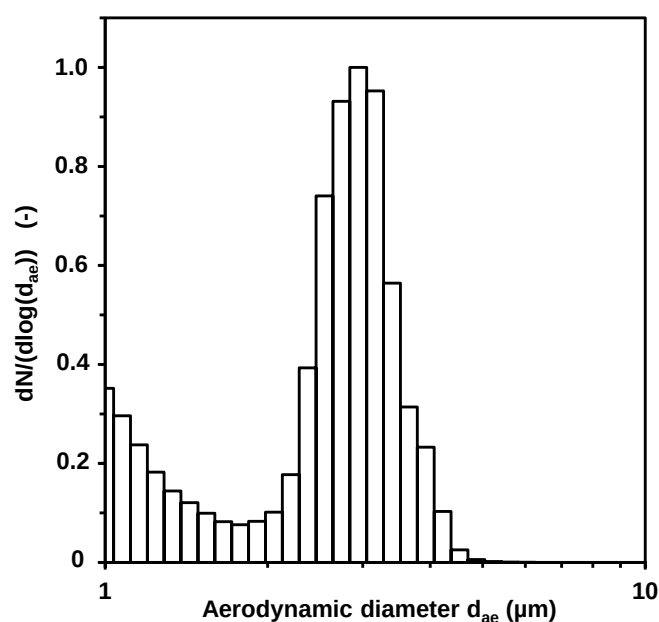


Figure 17 Size distribution of airborne particles in the bioaerosol generated from a liquid consortium of the 4 fungal strains. The aerodynamic diameter was measured using TSI™ APS 3321.

Repeatability and reproducibility of the bioaerosol generation

The different parameters measured during and after the generation for each generated bioaerosol are shown in Table 4. The count concentration of generated particles was $6.77 \times 10^6 \pm 0.2 \times 10^6$ p.m⁻³ for bioaerosol consortia and $7.24 \times 10^6 \pm 0.24 \times 10^6$ p.m⁻³ for pure bioaerosols. The concentration of culturable fungi ranged from 7.32×10^6 CFU.mL⁻¹ (bioaerosol consortia 1) to 2.0×10^8 CFU.mL⁻¹ (*Wallemia melicolla* bioaerosol). The concentration of culturable fungi in the generated bioaerosols was about $2\text{-}3 \times 10^6$ CFU.m⁻³ except for *Wallemia melicolla* which was found at 2.5×10^5 CFU.m⁻³. The number of counted colonies varied from 271 to 302 per generation in the three CFC collecting the bioaerosol (Table S4). The average number of colony per CFC was less than 100 with a reduced standard variation. This figure increased for the liquid suspensions. The numbers of ITS2 and 18S rDNA reads also varied depending on the generation and the liquid suspension. These read numbers were about 50000-60000 and no significant differences were found between the liquid suspensions and the bioaerosols ($p=0.17$).

Table 4 General generation runs data.

	Particle concentration (p.m ⁻³)	Aerodynamic diameter (μm)	Geometric standard deviation	Airborne fungi concentration (CFU.m ⁻³)	Fungi concentration in the suspension (CFU.mL ⁻¹)
Bioaerosol consortia 1	6.69x10 ⁶	2.95	1.16	3.76x10 ⁶	7.32x10 ⁶
Bioaerosol consortia 2	6.61x10 ⁶	2.95	1.16	3.13x10 ⁶	7.91x10 ⁶
Bioaerosol consortia 3	7.00x10 ⁶	2.95	1.16	3.80x10 ⁶	1.36x10 ⁷
<i>A. niger</i>	6.88x10 ⁶	3.45	1.10	3.40x10 ⁶	7.80x10 ⁷
<i>C. cladosporoides</i>	7.42x10 ⁶	2.75	1.17	1.80x10 ⁶	8.20x10 ⁷
<i>P. brevicompactum</i>	7.33x10 ⁶	2.45	1.12	2.20x10 ⁶	1.60x10 ⁷
<i>W. sebi</i>	7.31x10 ⁶	2.45	1.11	2.50x10 ⁵	2.00x10 ⁸

DNA extraction efficiency

Two common DNA extraction kits were used to compare their efficiencies and their impact on biodiversity results. The assays allowed the collection of 27 and 9 DNA samples per extract for bioaerosol consortia and liquid culture consortia, respectively. For six bioaerosol samples and one liquid culture sample extracted with the MO Bio kit, the amount of extracted DNA was not enough to be detected by the Nanodrop. For the other samples extracted with this method, the median of the amount of DNA was very low (1.5 ng.μL⁻¹). In qPCR, the mean numbers of the threshold cycle (Ct number) were 11.46 (liquid culture consortia) and 23.18 (bioaerosol consortia) for the MP Bio kit and 25.53 (liquid culture consortia) and 32.57 (bioaerosol consortia) for the MO Bio kit (figure 18). In our study, the MP Bio kit was significantly more efficient than the MO Bio kit regarding to the confidence interval at 95%. The DNA samples extracted with the MO Bio kit were not sequenced because of the bad extraction efficiency. The amount of DNA extract was under the required concentration recommended by the provider (3 ng.μL⁻¹).

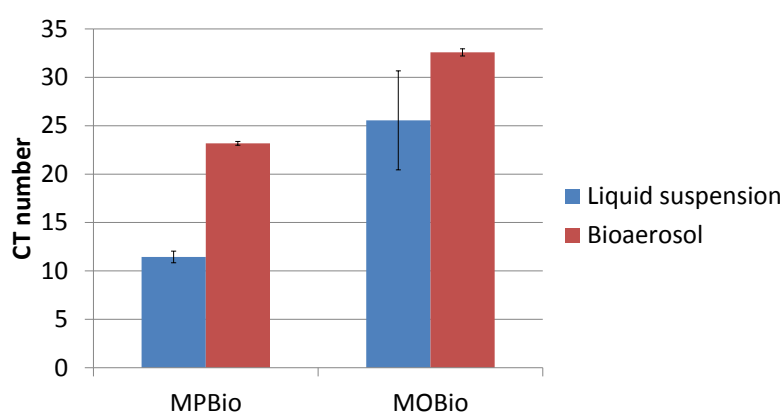


Figure 18 DNA concentration measured by qPCR in the fungal consortia samples. The values represented the average and the error bars indicated the confidence interval at 95%.

Fungal biodiversity

Impact of analytical tools

Fungal biodiversity was assessed using different methods and analytical strategies in bioaerosol consortia. The results indicate that three out of four molds were identified when the biodiversity was assessed by culture on the nutrient medium and morphological identification (figure 19). *Wallemia melicolla* was not observed in any samples, neither in the bioaerosol consortia nor in the liquid culture consortia. *Penicillium brevicompactum* was the dominant strain (53%) and *Aspergillus niger* and *Cladosporium cladosporioides* were found in the same proportion (23% and 24%, respectively).

When the biodiversity was assessed by sequencing, the reads were assigned at the genus level and *Wallemia* was the predominant genus (about 65%), found regardless of the targeted gene or the analytical strategy (figure 19). The proportion of *Cladosporium* was different depending on the analytical method and was 15.6% for the 18S sequencing and 27.3% with the ITS2 sequencing followed by BLAST assignment. It was not detected using ITS2 sequencing and assignment of the reads in the Mothur software. *Penicillium* was detected with all the methods and represented 4.8% of the 18S reads and about 2% of the ITS2 reads (with the two assignment algorithms). *Aspergillus* was the less detected mold using sequencing: not detected by 18S sequencing and only in low proportion using ITS2 sequencing (<1%). In addition to the four fungal strains that were generated, the DNA sequencing allowed the detection of other Fungi or Eukaryota (called “others” in figure 19). These other detected organisms represented 13% of the 18S reads, 5.4% of the ITS2 reads assigned with BLAST algorithm and 32.5% of the ITS2 reads assigned with the algorithm in Mothur. The 18S sequencing also detected DNA from Viridiplantae (1.2%), Metazoa (0.3%) or other fungi (11.4%) and more specially *Zygosaccharomyces* (11.1%). By ITS2 sequencing, the other found fungi depended on the algorithm used for the assignment. Others Basidiomycota or Ascomycota were found with the BLAST algorithm such as *Malassezia* (2.8%). Using the Wang method in Mothur, 28 others fungal genera were found. The most predominant was *Davidiella* (27.9%). *Malassezia* represented 3.0% of the ITS2 reads using this method.

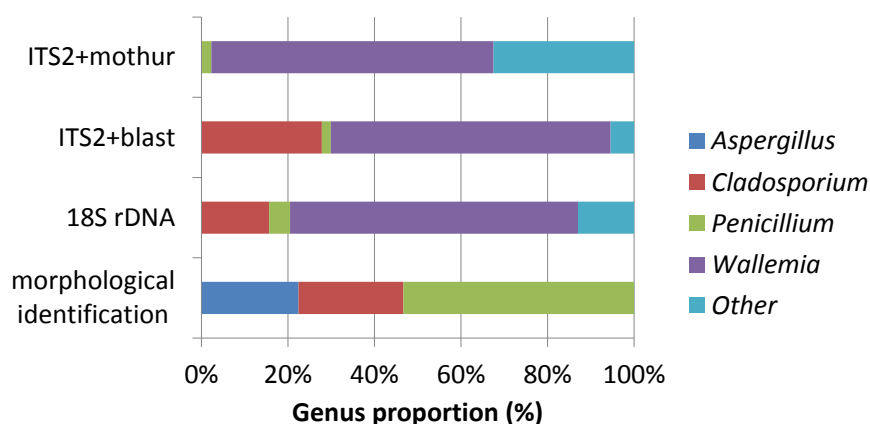


Figure 19 Fungal biodiversity in the bioaerosol consortia found using several methods. The value of each fungal proportions corresponded to the mean of proportions found in the three bioaerosol consortia.

Comparison between liquid cultures and bioaerosols consortia composition

The composition of the liquid cultures and bioaerosols consortia were assessed using the culture method and the ITS2 sequencing followed by BLAST for the reads assignment. The results showed that *Cladosporium* was found in lower proportion in the bioaerosols as compared to the liquid culture with a decrease of 6% by culture identification and 7.4% by ITS2 sequencing (figure 20). On the contrary, an increase in proportion was observed for *Aspergillus* (+ 2.7%) and *Penicillium* (+ 3.4%) by culture and for of *Wallemia* (+ 2%) and "Other" (+ 5%) by ITS2 sequencing. The suspensions and the bioaerosols showed nearly the same composition.

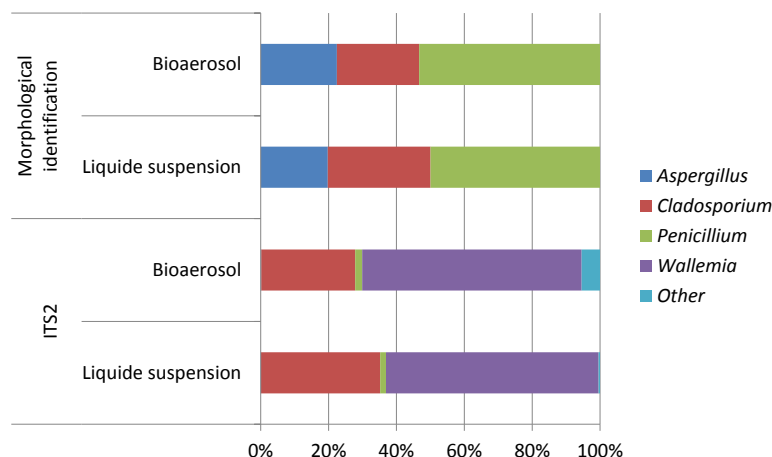


Figure 20 Fungal biodiversity in the bioaerosol consortia and suspension consortia found using culture and ITS2 sequencing. The value of each fungal proportions corresponded to the mean of proportions found in the three bioaerosol or suspension consortia.

DISCUSSION

The primary objective of the study was to investigate the impact of the analytical methods on biodiversity measurements in fungal bioaerosols produced in laboratory conditions. For that purpose, the generation of an experimental complex bioaerosols of known and reproductive characteristics (composition, concentration and size distribution) was required. Furthermore, it was important to insure that both the generation and the sampling processes executed during experimentations would not induce additional biases in biodiversity measurements.

Characterization of the complex fungal bioaerosols

We were able to generate a complex fungal bioaerosols from a mixed culture of *A. niger*, *P. brevicompactum*, *C. cladosporioides* and *W. melicolla*. These strains belong to the main fungal genera found in bioaerosols emitted in a waste sorting plant in a previous study (Degois et al., 2017). The generated bioaerosols had a mean d_{ae} of 2.95 μm (Figure 17).

When generated as single strain in bioaerosols, the size distributions of the *A. niger*, *P. brevicompactum*, *C. cladosporioides* and *W. melicolla* had median aerodynamic diameters of 3.45 μm , 2.45 μm , 2.75 μm and 2.45 μm , respectively (Figure S2-2). These values are close to previous studies; it may differ somewhat from previous experimental works, but this could be explained by differences between generation devices, particle size measuring instruments, aerosolization

operating conditions (e.g. relative humidity) or composition of the bioaerosol (e.g. proportion of mycelium, growth conditions before aerosolization) (Reponen *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2002). *A. niger* spores are globose or subglobose in shape and range from 2.5 to 5.0 μm in physical diameter (Raper and Fenell, 1965). Using a scanning electron microscope, Scheermeyer and Agranovski (2009) reported average sizes of generated spores of *A. niger* between 3.2 and 3.9 μm ; the smallest diameter measured was 2.1 μm (deflated spores) and the largest was 5.1 μm (rounded spores). Kanaani *et al.* (2008) measured a mean aerodynamic diameter for aerosolized *A. niger* spores of $3.51 \pm 0.08 \mu\text{m}$; more than 99% were between 2.3 and 5.8 μm . *P. brevicompactum* spores are spherical or slightly ellipsoidal and range from 3 to 4.5 μm in physical diameter (Samson *et al.*, 1995). Previous studies reported a mean aerodynamic diameter for aerosolized *P. brevicompactum* spores of 1.8–2.4 μm ($1.11 < \sigma_g < 1.17$) (Reponen *et al.*, 1996) or 2.56 ($\sigma_g < 1.15$) (Jankowska *et al.*, 2000). *C. cladosporioides* spores are ellipsoidal or show lemon-shaped and range from 3-7 $\times$ 2-4 μm (Samson *et al.*, 1995). Previous studies reported a mean aerodynamic diameter for aerosolized *C. cladosporioides* spores of 1.75–1.87 μm ($1.14 < \sigma_g < 1.17$) (Reponen *et al.*, 1996) or a modal aerodynamic diameter of $2.65 \pm 0.08 \mu\text{m}$ (Jung *et al.*, 2009).

Control and reproducibility of the generation process

Our generation methodology is based on the assumption that particles with an optical diameter greater than 1 μm are fungal entities. Consequently, the cumulated particle number concentration with an optical diameter greater than 1 μm , $C_N(d_{\text{opt}} > 1 \mu\text{m})$, was considered as an indicator of the total fungal concentration in the generated bioaerosol and the reproducibility of the experiments was determined according to a target value for $C_N(d_{\text{opt}} > 1 \mu\text{m})$ as close as possible to 7,000 $\#.\text{L}^{-1}$. The protocol used to prepare liquid cultures before aerosolization was specifically adapted to the needs of aerosol generation with our bubbling system. Thus, the populations of interest of fungal spores could easily be tracked by optical counter without being randomly affected by undesired residual particles. These residual, undesired particles are residues of the culture medium, salt, fungal debris or other impurities still present in the suspension despite the washing steps included in the preparation protocol (more comments are given in Sections S1 and S2 of the SI). The use of real-time indicator such as $C_N(d_{\text{opt}} > 1 \mu\text{m})$ is only possible because of the non-overlapping diameters of the biological particles population with another unknown and uncontrolled particle population (Figure 17 and S3). It allowed a better control / prediction of the biological parameters which were only measurable after subsequent analyses of samples.

The targeted count concentration was $7 \times 10^6 \text{ p.m}^{-3}$ to obtain a culturable concentration as close as possible to 10^6 CFU.m^{-3} . The particle count concentration target ($7 \times 10^6 \text{ p.m}^{-3}$) was achieved within a $\pm 6\%$ uncertainty for all the complex and simple fungal bioaerosols for three independent generation runs (Table 4). This reproducible particle count concentration consequently provided a reproducible culturable concentration (about 10^6 CFU.m^{-3}) except for *W. melicolla* which showed a culturable airborne concentration 10 times lower than expected. *W. melicolla* may have been more sensitive to the stress associated with the generation and the sampling on CFC than for others aerosolized strains, leading to a decrease in its culturability. While *W. sebi* is the only species of *Wallemia* capable of growth on media without additional solutes (NaCl, glucose), it remains a xerophilic species and the restricted growth conditions provided by the MEA medium probably impaired its growth (Zalar *et al.*, 2005). Despite this, *W. mellicola* was detected on MEA medium in

the single strain suspension and bioaerosols indicated the growing capacity of *Wallemia mellicola* on this particular medium.

The composition of the different bioaerosols varied in a wider range than the concentrations. The calculated confidence interval was more widespread for the culture method than for the NGS one. It reached more than 10% (*Penicillium* and *Aspergillus* proportions in liquid suspension) using culture and 6% (*Wallemia* 18S rDNA in bioaerosols) using NGS (data not shown). Indeed, the number of counted colonies (about 100-200 per sample) was very low as compared to the number provided by the sequencing (about 50000-60000). So, small variations in colonies number would lead to huger variations in proportion as compared to the number of reads.

Biodiversity biases due to sampling and generation process

The generated fungal bioaerosols were sampled using 37-mm closed-face cassette containing a 0.8 μm pore size polycarbonate membrane of as collection medium. The physical collection efficiency of a 1 μm pore size polycarbonate filter is close to 90% for 0.2 μm particle optical diameter and close to 100% for particle of optical diameter superior to 0.3 μm (Burton *et al.*, 2007). Thus, generated airborne fungal particles were fully collected in filters in our experiments with equal efficiency and the sampling process did not represent selective biases that could affect the actual biodiversity in the generated bioaerosols.

The results confirm that the four strains mixed in the liquid culture were aerosolized. However, it is not possible to attest that strains were aerosolized with an equal efficiency from the liquid culture. The fungal proportions in the bioaerosols are driven by the initial composition in the liquid suspension and by the aerosolization efficiency of individual strains. As the proportions in the bioaerosols and in the liquid suspension were nearly the same, the bioaerosol generation step might not have influenced the fungal proportions in bioaerosols. But, as the theoretical proportion of each strain in the liquid suspension was not exactly known, this is uncertain.

The use of microbial consortia to produce experimental microbiomes of known composition for biodiversity studies were performed in simulated liquid environments (Coronado *et al.*, 2005; Schäfer *et al.*, 2017) and in soil (Liebich *et al.*, 2007). However, tentative for generation of complex bioaerosols are scarce and the very few published studies reported bioaerosols made of a mixture of five bacteria (Perrott *et al.*, 2017) or one bacterium and one fungus (Forthomme *et al.*, 2013). Thus, our fungal model, composed of four different strains simultaneously generated, appears as an original methodology. Environmental bioaerosols are more complex than our bioaerosol model and the impact of the analytical methods could be different with a more complex fungal community. Such investigations will probably become widespread in order to generate aerosols realistic in terms of composition at the species level (Madsen *et al.*, 2016).

DNA extraction efficiency

The use of an efficient DNA extraction method is required for the accurate assessment of microbial biodiversity using NGS sequencing. In the present study, our primary aim was to investigate the effect of two commercial DNA extraction kits on both the quantitative (number of target gene copies) and qualitative (biodiversity) measurement of bioaerosols. The two DNA extraction kits (PowerSoil® DNA isolation kit, MOBio and FastDNA®SPIN kit for soil, MPBio) were chosen because of their frequent use in bioaerosol studies (Nieguitsila *et al.*, 2007; Dannemiller *et al.*

2014; Guo *et al.*, 2015; Kumari and Choi 2015). Results from quantitative measurements showed that the DNA extraction method had a significant effect on the extraction efficiency with a DNA amount about 10^3 higher (10 cycles) for the FastDNA®SPIN kit for soil as compared to the PowerSoil® DNA isolation kit. These results corroborate those from previous studies carried out on bioaerosols and other matrix showing that quantitative PCR results were influenced by the method used to extract nucleic acids from microbial cells (Haugland *et al.*, 2002, Hospodsky *et al.*, 2010, Desneux and Pourcher 2014).

We were not able to perform the comparison of qualitative measurements from the two commercial kits due to the insufficient amount of DNA extracted with the PowerSoil® DNA isolation kit. Indeed, the method used for DNA extraction has also been shown to impact the results of biodiversity measurements but findings are different from a study to another one. Experiments with in vitro-simulated microbial communities demonstrated that the biodiversity was depending on the method used to extract DNA (Morgan *et al.*, 2010). A study carried out with permafrost with five commercial kits, also revealed an impact of the DNA extraction kit on the biodiversity results after several analytical methods (Vishnivetskaya *et al.*, 2014). However, the PowerSoil® DNA isolation kit and FastDNA®SPIN kit for soil kits provided comparable results for bacterial community assessment. Another study underlined that an incomplete bacterial DNA extraction for soil was a source of bias for biodiversity measurements regarding bacterial communities, but not for fungal ones (Feinstein *et al.*, 2009).

Both our results and the literature findings suggest that the need to verify the ability of the DNA extraction method to provide subsequent amount of DNA for further molecular analytical steps. What's more, standardization of methods is required for further a comparison of results between studies to avoid DNA extraction bias.

Analytical tools for biodiversity assessment

To assess the impact of analytical tools for fungal the evaluation of biodiversity, culture-dependent and non-culture-dependent methods were used. For the sequencing, two genetic targets (18S rDNA and ITS2 region) and two methods for sequence assignation were compared. All the four fungal strains were detected throughout the study, but none of the used method allowed the detection of the four strains with a subsequent proportion. Furthermore, other fungal species than those initially added were detected in the generated bioaerosols.

Indeed, *W. mellicola* was poorly detected using culture followed by morphological identification. Among 867 grown colonies, about 20 were identified as *W. mellicola*. This xerophilic fungus was under unfavorable competitive conditions due to its slow growth on most of common culture media especially on the MEA medium (Zeng *et al.*, 2004; Flannigan 1997). Furthermore, *W. mellicola* forms small colonies (1-2 mm of diameter) that are only usually seen when the propagules of faster growing species are absent (Flannigan, 1997). On the other hand, by sequencing, regardless the genetic sequenced target and sequences analysis tools, *Wallemia* was the main genus found in bioaerosols and in liquid cultures. On the contrary, *Aspergillus* was found in subsequent proportion (> 20%) by culture but poorly detected by sequencing. To date, no universal efficient DNA extraction method was defined and DNA extraction is a critical step for PCR dependent analysis (Manian *et al.*, 2001; Fredricks *et al.*, 2005; Karakousis *et al.*, 2006; White *et al.*, 2010). It is supposed that the DNA extraction method used in the present study was not efficient on *A. niger* spores.

The two main explanations for detecting fungal species other than those initially added were a contamination of the generation and sampling (CFCs or filter) equipment, or an error of sequences assignment. Indeed, the composition of the liquid microbial suspension was in conformity with the added strains and it could be suggested a slight contamination of the sampling devices. What's more, others studies showed that microbial components, like glucans, were present on the filters which were decontaminated before use (Shogren and Park 2011). Among the "others", the genus *Davidiella* was assigned to several fungal reads in the database (Silva database for 18S rDNA assignment). *Davidiella* is a *Cladosporium*-like genus and the two genera are confined (Braun *et al.*, 2003). Data analysis interpretation is depending on the accuracy, the uniformity of the taxonomic assignment of the databases. But, it was shown by several studies that ITS barcode did not allow a good identification of the fungal communities because of misidentification of fungal sequences, sequencing errors or shortness of the reads (Nilsson *et al.*, 2009; Ovaskainen *et al.*, 2010). Moreover, the assignment of fungal sequences using BLASTn method seemed to be reliable (Yamamoto *et al.*, 2014). The proportions of the fungal strains could also be affected by the choice of the primers or by the number of the 18S rDNA and ITS2 copies (Bellemain *et al.*, 2010).

As a consequence, the results showed that the biodiversity results depended on the methods used to assess it from the principle of the method (culture vs sequencing) to bioinformatics step. Neither the culture method nor the NGS methods allowed the recovery of all fungal strains in the liquid cultures and in the bioaerosols. But, the culture-dependent method and ITS2 sequencing followed by BLASTn assignment gave complementary results and both the methods can give useful data for a better understanding of the environmental bioaerosol composition.

CONCLUSION

The purpose of the present study was to identify the limits and the biases of the analytical tools commonly used to assess the fungal biodiversity to choose a reliable measurement processing but not to optimize each step of these processing. Laboratory experiments allowed controlling the liquid suspension composition for a better interpretation of the results and understanding the boundaries compared to an unknown environmental samples. Every steps of the analytical processing (method of identification, DNA extraction, and genetic target for sequencing and bioinformatics) had an important impact on biodiversity results. It demonstrated the significance of the standardization of the measurement processing for comparative study.

REFERENCES

- Bellemain, E.T., Carlsen ,T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol* 10: 189-198.
- Braun, U., Crous, P. W., Dugan, F., Groenewald, J. Z., Sybren De Hoog, G. (2003). Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. str. *Mycol Prog.* 2: 3-18.
- Bru-Adan, V., Wery, N., Moletta-Denat, M., Boiron, P., Delgenes, J. P., and Godon, J. J. (2009). Diversity of bacteria and fungi in aerosols during screening in a green waste composting plant. *Current microbiology* 59, 326-335.
- Burton, N. C., Grinshpun, S. A., Reponen, T. (2007). Physical collection efficiency of filter materials for bacteria and viruses. *Ann Occup Hyg.* 51:143-151.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., et al. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat methods.* 7: 335-336.

- Coronado, J. M., Soria, J., Conesa, J. C., Bellod, R., Adán, C., Yamaoka, H., Loddó, V., and Augugliaro, V. (2005). Photocatalytic inactivation of *Legionella Pneumophila* and an aerobic bacteria consortium in water over TiO₂/SiO₂ fibres in a continuous reactor. *Topics in Catalysis* 35, 279-286.
- Dannemiller, K. C., Lang-Yona, N., Yamamoto, N., Rudich, Y., Peccia, J. (2014). Combining real-time PCR and next-generation DNA sequencing to provide quantitative comparisons of fungal aerosol populations. *Atmos Environ.* 84: 113-121.
- Dannemiller, K. C., Reeves, D., Bibby, K., Yamamoto, N., Peccia, J. (2014). Fungal High-throughput Taxonomic Identification tool for use with Next-Generation Sequencing (FHiTINGS). *J Basic Microb.* 54: 315-321.
- Degois, J., Clerc, F., Simon, X., Bontemps, C., Leblond, P., Duquenne, P. (2017). First metagenomic survey of the microbial diversity in bioaerosols emitted in waste sorting plants. *Ann Work Expo Health.* 61:1076-1086.
- Desneux, J. Pourcher, A.M. (2014). Comparison of DNA extraction kits and modification of DNA elution procedure for the quantitation of subdominant bacteria from piggery effluents with real-time PCR. *MicrobiologyOpen.* 3: 437-445.
- Ding, W., Li, L., Han, Y., Liu, J., and Liu, J. (2015). Site-related and seasonal variation of bioaerosol emission in an indoor wastewater treatment station: level, characteristics of particle size, and microbial structure. *Aerobiologia* 32, 211-224.
- Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D. (2003). Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann Occup Hyg.* 47: 187-200.
- Duquenne, P., Simon, X., Koehler, V., Goncalves-Machado, S., Greff, G., et al. (2012). Documentation of bioaerosol concentrations in an indoor composting facility in France. *J. Environ. Monit.* 14:409-419.
- Duquenne (2018). On the identification of culturable microorganisms for the assessment of biodiversity in bioaerosols. *Ann Work Expo Health.* 62: 139-146.
- Dylag, M. (2017). Fungi present in home and their impact on human health-A short review. *Insights J Biol Med.* 1: 16-25.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics.* 27: 2194-2200.
- Feinstein, L.M., Sul, W.J., Blackwood, C.B. (2009). Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. *Appl Environ Microb.* 75: 5428-5433.
- Flannigan, B. (1997). Air sampling for fungi in indoor environments. *J. Aerosol Sci.* 28: 381-392.
- Forthomme, A., Andres, Y., Joubert, A., Simon, X., Duquenne, P., Bemer, D., and Le Coq, F. (2013). Evolution of microbial aerosol behaviour in heating, ventilating and air-conditioning systems – quantification of *Staphylococcus epidermidis* and *Penicillium oxalicum* viability. *Environmental Technology* 34, 993-997.
- Fredricks, D. N., Smith, C., Meier, A. (2005). Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol.* 43: 5122-5128.
- Fung, F., Hughson, W. G. (2003). Health effects of indoor fungal bioaerosol exposure. *Appl Occup Environl Hyg.* 18: 535-544.
- Guo, H., Yu, Z., Zhang, H. (2015). Phylogenetic diversity of microbial communities associated with coalbed methane gas from Eastern Ordos Basin, China. *Int J Coal Geol.* 150–151: 120-126.
- Haugland R. A., Brinkman N., Vesper S. J. (2002). Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *J Microbiol Meth.* 50: 319-323.
- Haugland, R. A., Heckman, J. L., Wymer, L. J. (1999). Evaluation of different methods for the extraction of DNA from fungal conidia by quantitative competitive PCR analysis. *J Microbiol Meth.* 37: 165-176.
- Hospodsky, D., Yamamoto, N., Peccia, J. (2010). Accuracy, precision, and method detection limits of quantitative PCR for airborne bacteria and fungi. *Appl Environ Microbiol* 76: 7004-7012.
- Jankowska, E., Reponen, T., Willeke, K., Grinshpun, S. A., Choi, K.J. (2000). Collection of Fungal Spores on Air Filters and Spore Reentrainment from Filters into Air. *J. Aerosol Sci.* 31: 969–978.
- Jung, J.H., Lee, C.H., Lee, J.E., Lee, J.H., Kim, S.S., Lee, B.U. (2009). Design and characterization of a fungal bioaerosol generator using multi-orifice air jets and a rotating substrate. *J. Aerosol Sci.* 40: 72-80.
- Kanaani, H., Hargreaves, M., Smith, J., Ristovski, Z., Agranovski, V., Morawska, L. (2008). Performances of UVAPS with respect to detection of airborne fungi. *J. Aerosol Sci.*, 39: 175-189.
- Karakousis, A., Tan, L., Ellis, D., Alexiou, H., Wormald, P. J. (2006). An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *J Microbiol Meth.* 65: 38-48.
- Kristiansen, A., Saunders, A. M., Hansen, A. A., Nielsen, P. H., and Nielsen, J. L. (2012). Community structure of bacteria and fungi in aerosols of a pig confinement building. *FEMS microbiology ecology* 80, 390-401.
- Kumari, P., Choi, H. (2015). Manure removal system influences the abundance and composition of airborne biotic contaminants in swine confinement buildings. *Environ Monit Assess.* 187: 1-10.
- Lee, B. U., Kim, S.H., Kim, S. S. (2002). Hygroscopic growth of *E. coli* and *B. subtilis* bioaerosols. *J. Aerosol Sci.* 33: 1721–1723.
- Liebich, J., Schloter, M., Schäffer, A., Vereecken, H., and Buraue, P. (2007). Degradation and humification of maize straw in soil microcosms inoculated with simple and complex microbial communities. *European Journal of Soil Science* 58, 141-151.

- Madsen, A. M., Larsen, S. T., Koponen, I. K., Kling, K. I., Barooni, A., Karottki, D. G., Tendal, K., Wolkoff, P. (2016). Generation and characterization of indoor fungal aerosols for inhalation studies. *Appl Environ Microbiol.* 82: 2479-2493.
- Manian, S., Sreenivasaprasad, S., Mills, P. R. (2001). DNA extraction method for PCR in mycorrhizal fungi. *Lett in Appl Microbiol.* 33: 307-310.
- Morgan, J. L., Darling, A. E., Eisen, J. A. (2010). Metagenomic sequencing of an in vitro-simulated Microbial Community. *PLoS One.* 5: e10209.
- Nieguitsila, A., Deville, M., Jamal, T., Halos, L., Berthelemy, M., Chermette, R., et al. (2007). Evaluation of fungal aerosols using Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE) and comparison with culture. *J Microbiol Meth.* 70: 86-95.
- Nilsson, R.H., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sjökvist, E., Kristiansson, E. (2009). The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiol Lett.* 296: 97-101.
- Ovaskainen, O., Nokso-Koivisto, J., Hottola, J., Rajala, T., Pennanen, T., Ali-Kovero, H., et al. (2010). Identifying wood-inhabiting fungi with 454 sequencing – what is the probability that BLAST gives the correct species? *Fungal Ecol.* 3: 274-283.
- Perrott, P., Turgeon, N., Gauthier-Levesque, L., and Duchaine, C. (2017). Preferential aerosolization of bacteria in bioaerosols generated in vitro. *Journal of Applied Microbiology* 123, 688-697.
- Raper, K.B. and Fennell, D.I. (1965). The Genus *Aspergillus*, Baltimore: Williams & Wilkins Company, 686p.
- Reponen, T., Willeke, K., Ulevicius, V., Reponen, A., Grinshpun, S. A. (1996). Effect of Relative Humidity on the Aerodynamic Diameter and Respiratory Deposition of Fungal Spores. *Atmos. Environ.* 30: 3967–3974.
- Samson, R.A., Hoekstra, E., Friswald, J.C. and Filtenborg, O. (1995). Introduction to Foodborne Fungi, 3rd Ed., Baarn, Delft, Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands.
- Schäfer, J., Weiß, S., and Jäckel, U. (2017). Preliminary validation of a method combining cultivation and cloning-based approaches to monitor airborne bacteria. *Annals of Work Exposures and Health* 61, 633-642.
- Scheermeyer, E., Agranovski, I.E. (2009). Design and evaluation of a new device for fungal spore aerosolization for laboratory applications. *J. Aerosol Sci.* 40: 879-889.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., et al. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol.* 75: 7537-7541.
- Shogren, E. S., Park, J. H. (2011). Pre-sampling contamination of filters used in measurements of airborne (1,3)-beta-d-glucan based on glucan-specific Limulus amoebocyte lysate assay. *J Environ Monitor* 13: 1082-1087.
- Simon, X., Duquenne, P., Koehler, V., Piernot, C., Coulais, C., Faure, M. (2011). Aerosolisation of *Escherichia coli* and associated endotoxin using an improved bubbling bioaerosol generator. *J. Aerosol Sci.* 42: 517-531.
- Tolvanen, O. K. (2001). Airborne bio-aerosols and noise in a dry waste treatment plant in Pietarsaari, Finland. *Waste management and research* 19, 108-114.
- Vishnivetskaya, T. A., Layton, A. C., Lau, M. C. Y., Chauhan, A., Cheng, K. R., Meyers, A. J., et al. (2014). Commercial DNA extraction kits impact observed microbial community composition in permafrost samples. *FEMS Microbiol Ecol.* 87: 217-230.
- White, P. L., Perry, M. D., Loeffler, J., Melchers, W., Klingspor, L., Bretagne, S., et al. (2010). Critical Stages of Extracting DNA from *Aspergillus fumigatus* in Whole-Blood Specimens. *J Clin Microbiol.* 48: 3753-3755.
- Yamamoto, N., Dannemiller, K. C., Bibby, K., Peccia, J. (2014). Identification accuracy and diversity reproducibility associated with internal transcribed spacer-based fungal taxonomic library preparation. *Environ Microbiol.* 16: 2764-2776.
- Yoo, K., Lee, T. K., Choi, E. J., Yang, J., Shukla, S. K., Hwang, S. I., et al. (2017). Molecular approaches for the detection and monitoring of microbial communities in bioaerosols: A review. *J Environ Sci.* 51: 234-247.
- Zalar, P., Sybren de Hoog, G., Schroers, H. J., Frank, J. M., Gunde-Cimerman, N. (2005). Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (Wallemiomycetes and Wallemiales, cl. et ord. nov.). *Antonie van Leeuwenhoek.* 87:311–328.
- Zeng, Q. Y., Westermarck, S. O., Rasmuson-Lestander, Å., Wang, X. R. (2004). Detection and quantification of *Wallemia sebi* in aerosols by real-time PCR, conventional PCR, and cultivation. *Appl Environ Microbiol* 70: 7295-7302.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

S1 Generated particle size distribution measured with the OPC-Grimm® and use of the real-time indicator $C_N(d_{opt} > 1 \mu m)$

Examples of the size distribution of airborne particles as a function of their optical diameter, measured using a Grimm® G1109, are shown in Fig. S1-1.

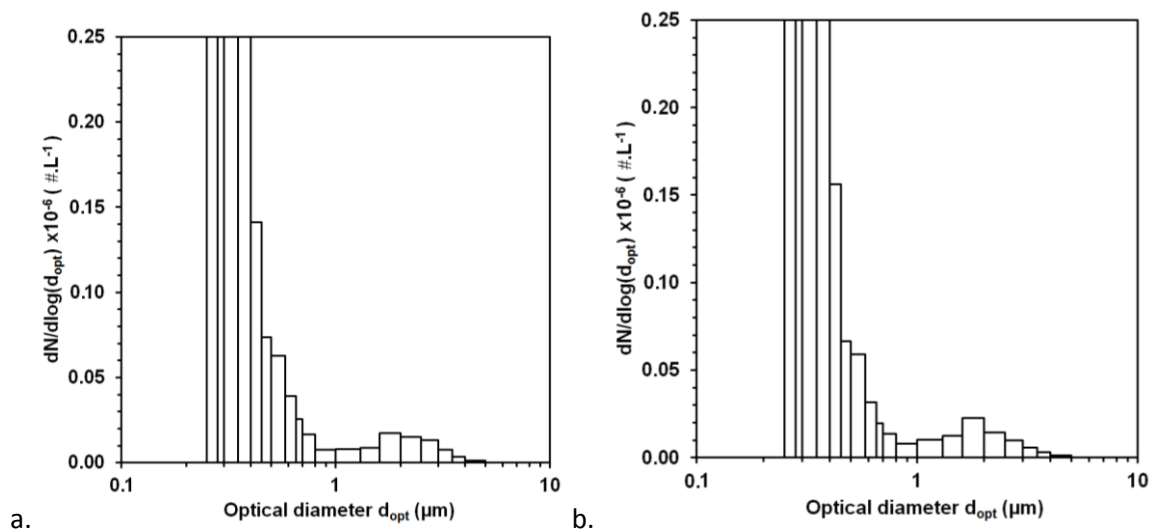


Figure S 1 Size distribution for particles generated measured with Grimm® G1109. Examples for the 4-strains mixing (a) and for *Wallemia melicolla* (b).

The size distributions of the bioaerosols indicate that two distinct particle populations are generated. These two populations are separated around a diameter of 1 μm .

A first population, corresponding to optical diameters between 1 and 5 μm is fully visible. This population presents a median optical diameter close to 1.8 μm with a geometric standard deviation close to 1.35. These descriptive parameters vary little with test day or liquid culture generated: between 1.6 and 2 μm for the median optical diameter and between 1.32 and 1.40 for the geometric standard deviation across all the tests performed.

A second population of particles with a diameter of less than 1 μm is also visible on Fig. S1a and Fig. S1b. This population is not fully characterized by the Grimm® G1109 which is only capable of detecting a portion of the distribution ($0.25 < d_{opt} < 1 \mu m$). These residual, undesired particles are, probably, residues of the culture medium or fungal debris still present in the suspension despite the washing steps included in the preparation protocol. Part of this could also be due to impurities or dissolved particles present in the water, resulting in the formation of residual particles after droplet drying. Whatever their origins or nature, the presence of these residual particles is not a problem given that the size distribution of the fungal particles population remains quite discernible and identifiable.

Particles with an optical diameter greater than $1\text{ }\mu\text{m}$ are considered to be fungal entities, whether they are culturable, non-culturable or dead cells. The cumulated particle number concentration with an optical diameter greater than $1\text{ }\mu\text{m}$, $C_N(d_{\text{opt}} > 1\text{ }\mu\text{m})$, was considered in our tests as an indicator of the total fungal concentration in the generated bioaerosol. All experiments were performed using a target value for $C_N(d_{\text{opt}} > 1\text{ }\mu\text{m})$ as close as possible to $7,000\text{ }\#.\text{L}^{-1}$. The operator then attempted to maintain $C_N(d_{\text{opt}} > 1\text{ }\mu\text{m})$ at the target value to improve stability during aerosol generation or to improve inter-assay reproducibility. In both cases, the same method was used: slight adjustment of the bubbling flow rate to maintain the target value near $7,000\text{ }\#.\text{L}^{-1}$. The OPC is a necessary element of the test rig insofar as it gives real time data. Depending on the day of generation, the seven 60-min averaged values of $C_N(d_{\text{opt}} > 1\text{ }\mu\text{m})$ were comprised between 6,620 and $7,430\text{ }\#.\text{L}^{-1}$.

S2 Further results concerning size distribution of the particles generated measured with TSITM APS 3321

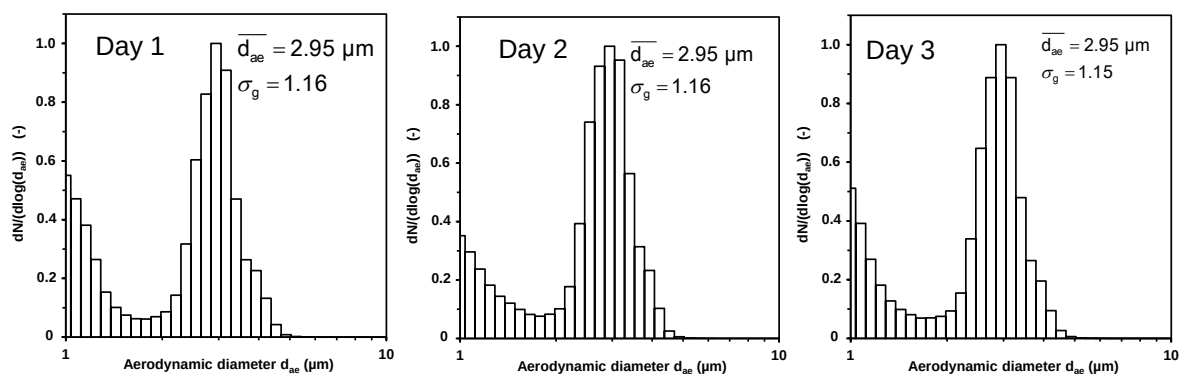


Figure S 2 Size distributions for particles generated using the 4-strains mixing liquid cultures.

The size distributions of the bioaerosols measured with the TSITM APS indicate that two distinct particle populations are generated. These two populations are separated around a diameter of $1.7\text{ }\mu\text{m}$.

A first population, corresponding to aerodynamic diameters between 1.7 and $6\text{ }\mu\text{m}$ is fully visible on the figures. This population presents a median aerodynamic diameter of $2.95\text{ }\mu\text{m}$ with a geometric standard deviation close to 1.16 . These descriptive parameters vary little with test day.

A second population of particles with a diameter of less than around $1.7\text{ }\mu\text{m}$ is also visible on Fig. S2. These residual, undesired particles are, probably, residues of the culture medium or fungal debris still present in the suspension despite the washing steps included in the preparation protocol. Part of this could also be due to impurities or dissolved particles present in the water, resulting in the formation of residual particles after droplet drying. Whatever their origins or nature, the presence of these residual particles is not a problem given that the size distribution of the fungal particles population remains quite discernible and identifiable.

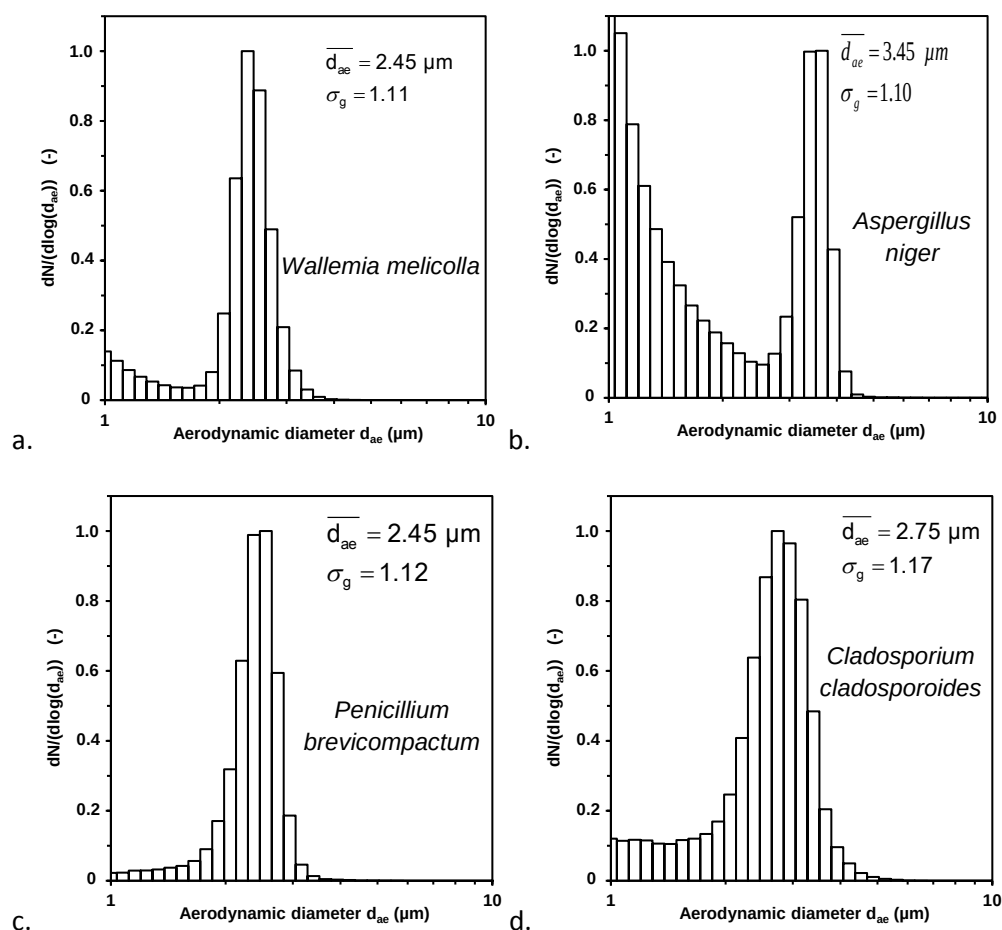


Figure S 3 Size distributions and size distribution parameters for particles generated using a liquid culture of a. *Wallemia melicolla*, b. *Aspergillus niger*, c. *Penicillium brevicompactum* and d. *Cladosporium cladosporioides*. The aerodynamic diameter measured was measured using TSITM APS 3321.

Table S 4 Fungal biodiversity determining data in the suspensions and in the bioaerosols.

	Suspension 1	Suspension 2	Suspension 3
Colony number per generation	171	180	166
Number of 18S rDNA reads	54123	50954	55928
Number of ITS2 reads	55721	51573	62361

	Generation 1	Generation 2	Generation 3
Colony number per generation	294	271	302
Average number of colony per CFC	98±2	84±7	101±6
Number of 18S rDNA reads	52705	63087	58415
Number of ITS2 reads	60378	55623	69694

Partie 4

Suivi sur un an de la biodiversité microbienne dans les bioaérosols émis dans un centre de tri

Partie 4: Suivi sur un an de la biodiversité microbienne dans les bioaérosols émis dans un centre de tri

1. Résumé

Les activités de tri des déchets sont une source d'émission de bioaérosols. Les expositions des salariés à ces bioaérosols ont été associées avec différents troubles respiratoires tels que de l'asthme, des rhinites ou des pneumopathies d'hypersensibilité. La composition microbienne des bioaérosols émis dans ce secteur d'activités est très peu renseignée dans la littérature. Les données publiées ont été obtenues par une approche basée sur la cultivabilité avec une identification des microorganismes par différentes méthodes. Du fait des limites des techniques culture-dépendante qui sont bien connues, la biodiversité peut être sous-estimée. Les progrès en biologie moléculaire ont permis le développement de nouvelles techniques d'analyse telles que le séquençage d'ADN à haut débit (NGS). Les NGS permettent l'exploration de la biodiversité dans divers environnements en s'affranchissant des limites des approches par culture. L'objectif de cette étude était de caractériser la biodiversité bactérienne et fongique par séquençage à haut débit, dans un centre de tri des déchets, et ce, sur une année.

L'entreprise de tri des déchets investiguée employait environ 50 salariés essentiellement dédiés au tri manuel des déchets tels que des journaux, des papiers, des cartons, des emballages alimentaires et autres types de déchets recyclables. Tous les mois pendant un an, les échantillons de bioaérosols ont été collectés à cinq points de l'entreprise par filtration sur un filtre en polycarbonate dans une cassette fermée de 37 mm pendant 5h à 10 L.min⁻¹. Un prélèvement dans un bureau non contaminé par les déchets a également été prélevé en parallèle pour constituer une référence intérieure. Après transport réfrigéré des échantillons, ils ont été conservés à 4°C au laboratoire avant leur analyse dans les 24h suivantes. Les particules ont été éluées du filtre par ajout d'une solution aqueuse et de Tween 80 à 0,01% et agitation à 2000 rpm pendant 20 min. L'ADN a ensuite été extrait avec le kit FastDNA®SPIN kit for soil de MPBiomedicals selon les instructions du fabricant. Le séquençage des régions ADNr 16S (bactéries) et ITS2 (champignons) a été réalisé par un prestataire extérieur en utilisant la plateforme MiSeq de Illumina. Le pré-traitement des séquences a été effectué avec le logiciel Mothur (Schloss et al. 2009). Les séquences ont été assignées par comparaison avec la base de données SILVA pour l'ADNr 16S et UNITE pour l'ITS2.

Au cours des douze journées de prélèvements, 72 échantillons de bioaérosols ont été prélevés ; la biodiversité bactérienne a pu être caractérisée dans 63 échantillons et la biodiversité fongique dans 68. La plupart des échantillons ont pu être séquencés. Les autres contenaient de faibles concentrations en ADN et ont été prélevés soit en hiver soit au niveau de la référence. Tous les bioaérosols étaient composés de quatre phyla bactériens prédominants : Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes et Proteobacteria. Les proportions d'Actinobacteria et de Firmicutes étaient plus importantes dans les échantillons prélevés au cœur des activités que dans la référence intérieure.

Au total, 605 genres bactériens ont été détectés pendant l'année de prélèvement dont 57 étaient prédominants. Parmi les genres majoritaires dans l'entreprise, il y avait un grand nombre de

Firmicutes comme *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* mais aussi *Prevotella* (Bacteroidetes) ou *Pseudomonas* (Proteobacteria). Les genres prédominants détectés au cœur des activités ne sont pas les genres dominants de la référence intérieure suggérant une différence de biodiversité entre les points exposés aux déchets et les locaux administratifs. Le nombre de genres fongiques détectés lors de la campagne de prélèvement était de 592. Comme pour les taxons bactériens, une variation importante du nombre de taxons et de leurs proportions a été observée durant l'année de prélèvement. Néanmoins certains genres étaient présents en abondance relative importante au sein des activités comme *Wallemia*, *Cladosporium*, *Debaryomyces*, *Candida* ou *Penicillium*.

La richesse de la composition microbienne dans les bioaérosols lors de la campagne s'est révélée plus importante dans notre étude que dans les études précédentes avec l'utilisation de méthodes culture-dépendantes. La biodiversité microbienne était complexe avec certains taxons qui sont retrouvés tout au long de l'année de prélèvement mais en abondance variable.

2. Article 3 : One year follow-up of microbial diversity in bioaerosols in a French waste sorting plant

Jodelle Degois¹, Xavier Simon¹, Cyril Bontemps², Pierre Leblond², Philippe Duquenne¹

¹Department of pollutant metrology, Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), Vandoeuvre-lès-Nancy 54500, France; ²Université de Lorraine, Institut National de la Recherche Agronomique, Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne (DynAMic), UMR INRA 1128, Nancy 54000, France

Article non soumis

ABSTRACT

Domestic waste recycling showed an increased activity in developed countries. More and more workers are thus exposed to the bioaerosols emitted during the waste treatment activities. However, so far, little is known regarding the complex microbial composition of such aerosol and their potential risk for the worker health. The objective of this study was thus to monitor the variation of this biodiversity over a year in a waste sorting center. To do so, we used a noncultured-biased method in using high-throughput sequencing and metagenomics approaches. Bioaerosols were collected every month in a waste sorting center using filtration-device at five waste-exposed locations. In general, the bioaerosols appeared complex in term of composition and with a high microbial biodiversity different from those encounter in an indoor reference. Most of the microbial diversity found in all samples was represented by the same predominant genera that were *Staphylococcus*, *Prevotella*, *Pseudomonas* and others Firmicutes or Proteobacteria genera for bacteria and *Wallemia*, *Cladosporium*, *Candida*, *Penicillium* and *Debaryomyces* for the fungi. Despite these genera constituted the core of the bioaerosols microbial diversity, variations were observed in their proportion during the year and also of the working place.

INTRODUCTION

The treatment of waste is an important issue in our society. For 2020, the European Union plan to increase the amount of domestic waste recycled to reach 50% of the overall waste mass (Council of the European Union, 2008). In France, the number of waste sorting plants (WSP) increased from 265 to 410 between 2000 and 2014 (ADEME 2015). They treated several million tons of non-hazardous household or industrial wastes every year. The numbers of workers in the type of activity increased too and the waste treatment is an occupational source of biological exposure to airborne microorganisms as bacteria and fungi, or biological compounds as endotoxins or (1,3)- β -D-glucans. Health disorders as respiratory, gastrointestinal or dermatologic outcomes were reported in household waste handling tasks and waste treatment plants (Heldal et al. 2003, Perez et al. 2006). The respiratory symptoms often described in the literature are upper respiratory tract irritation, dry cough, respiratory failure, fever, bronchoconstriction, allergic asthma and rhinitis, hypersensitivity pneumonitis (Douwes *et al.*, 2003; Lavoie *et al.*, 2006; Giusti, 2009). Previous studies, in waste treatment activities, provided data about concentrations of bacteria and fungi using culture methods (Breum *et al.*, 1999; Reinthaler *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2013).

The microbial biodiversity in bioaerosols from WSPs was poorly studied and the few studies about the microbial composition were carried out using culture-dependent method and showed that

the genera *Aspergillus* and *Penicillium* were the predominant fungi (Breum *et al.*, 1999; Lehtinen *et al.* 2013; Viegas *et al.*, 2014). The culture-methods are known to underestimate the composition and the concentration of airborne microorganisms (Duquenne 2017). A better measurement of the microbial composition of occupational bioaerosols would improve the knowledge about their characterization on the dose/response relationship which is not established yet. Since a decade, the next generation sequencing (NGS) provided a new approach for microbial environmental studies. It was already used to characterize microbial community in various environments such as human microbiome (Human Microbiome Project, 2012), soil (Arfi *et al.*, 2012; Uroz *et al.*, 2013), water (Quaiser *et al.*, 2011; Somboonna *et al.*, 2012) and so on. In bioaerosols emitted at occupational places, the NGS provided data about airborne biodiversity in swine houses (Nehme *et al.*, 2008; Kumari and Choi 2015), composting (Mbareche *et al.*, 2017) or waste water treatment plant (Lin *et al.*, 2014; Ding *et al.*, 2016). The molecular methods overcame the culture-limits but can introduce other types of bias such as DNA extraction efficiency, errors of sequencing etc (for NGS). The NGS biodiversity measurements revealed more complexity of microbial communities in bioaerosols emitted in WSP with more detected microbial taxa than the ones found with culture-dependent methods (Degois *et al.*, 2017).

In previous published studies (Lehtinen *et al.*, 2013; Viegas *et al.*, 2014), the biodiversity was generally assessed by collecting a limited number of bioaerosols samples. However the representativeness of these samples in regard with the potential variations of bioaerosol biodiversity over time and in space is uncertain. Furthermore, learning about variations in composition of microbial communities to which workers are exposed to would improve the understanding of biological risks at the workplace. Previous studies have reported variations of airborne microorganism communities in different occupational environments (Adams *et al.*, 2013; Emerson *et al.*, 2016; Kumari *et al.*, 2016). Time and spatial variations of microbial concentrations were shown during waste collection and in indoor air (Frankel *et al.* 2012, Park *et al.*, 2013). However, variations in biodiversity were not investigated in WSP. The aims of the present study were: 1) to characterize the bacterial and fungal biodiversity in bioaerosols at six sampling areas of a WSP, 2) to assess the time and spatial variations of the microbial biodiversity.

MATERIALS AND METHODS

Waste sorting plant description

The investigated French waste sorting plant treated household wastes and non-hazardous industrial waste produced by 44 towns (about 235 000 inhabitants). The plant sorted journal newspapers, papers, cardboards, food packaging and other sorting wastes. The refusal wastes, which were non-recyclable, were burnt to supply the hot water system of the town. About 50 workers were employed for the sorting activity. The work was organized in two shifts, the first one in the morning and the second one in the afternoon. Five stationary sampling points were located inside the waste treatment activities (waste-exposed locations) and a reference sampling was located in an office (indoor reference) (table 5).

Table 5 Description of the stationary sampling locations in the waste sorting plant.

Name	Description of the sampling point	Amount of waste treated (t)
Unloading waste area	Wastes are unloading on the floor by lorries, then they are carried in the first-sorting cabin by a conveyor	73.79 ± 8.64
First-sorting cabin	Removing the big cardboards by two workers	No data
Sorting cabin	Manual wastes sorting by a dozen workers	No data
Press/storage	Packaging of sorted waste into bales and Storing of paper and cardboard bales	25.18 ± 6.69
Shredder	Shredding of industrial waste as furniture	15.81 ± 4.77
Indoor reference	Meeting room	0

Bioaerosols sampling

Bioaerosols were sampled at each sampling locations each month of 2016 (12 collected samples by sampling locations). To performed bioaerosol sampling, 37 mm closed-face cassettes (CFC) equipped with a polycarbonate filter (Nuclepore®, 0.8 µm pore size) and a backing cellulose pad (Millipore®, thick cellulose absorbent pad) were connected to constant flow pumps (Bravo, Tecora, France) calibrated at the flow rate of 10 L.min⁻¹ using a flow meter (Mass Flowmeter 4040, TSI Inc., USA). Flow rates were measured before and after the sampling. CFCs were placed at 1.7 m above ground level and the sampling was conducted for five hours during the work shift. To assess the environmental conditions, temperature and relative humidity were measured using a real-time measuring devices (Labguard® 3D Mobiguard, Biomérieux, France) located near each sampling device. All samples were transported to the laboratory in a cold box, stored at 4°C and analyzed within 24 hours after being collected.

Samples analysis

To elude the particles from the filter, a volume of 5 mL of a sterile solution (0.01 % Tween 80 in ultra-pure water) was introduced into the cassettes by the inlet. Then, the cassette inlets and outlets were closed with caps and shook (Heildolph®, Multi-Reax shaker) at 2000 rpm for 20 min and at room temperature. The genomic DNA extraction was performed using a commercial kit (FastDNA® SPIN kit for soil, MP Biomedicals, Illkirch, France), according to the manufacturer's instructions, with 500 µL of eluted particle solution. The DNA samples were stored at -20°C until sequencing.

DNA sequencing and sequence data analysis

The DNA samples were purified, amplified and sequenced by INRA Transfert Environnement (Narbonne, France). The bacterial biodiversity was performed using the universal primers F-GTGYCAGCMGCCGCGGTA and R-CCCGYCAATTCMTTTRAGT which targeting the 16S rDNA (v3-v5 variable region). The primers used to amplify the specific fungal barcode ITS2 were w404 CTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTGTGARTCATCGAATCTTTG and w40 GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCGCTTATTGATATGC. For the DNA amplification by PCR, the mixture contained: 5 µL of DNA template, 4 µL of dNTPs (25 mM), 1 µL of each primer (100 ng.µL⁻¹), and 0.5 µL of Taq polymerase in a total volume of 50 µL. The PCR cycle was 2 min at 95°C

(denaturation step), 1 min at 56°C or 65°C for ITS2 or 16S rDNA amplification respectively (annealing step) and 1 min at 72°C (elongation step). The two genetics target were sequenced using Miseq technology (Illumina, San Diego, USA). After sequencing, the reads were trimmed, denoised; barcodes, primers and homopolymers longer than 8 pb were removed using Mothur (v.1.37.4) software (Schloss *et al.*, 2009). Chimera were detected and deleted using UNCHIME (Edgar *et al.*, 2011) executed in Mothur. Then, the reads with 100% of identity were clustered in a unique sequence. The bacterial reads were assigned by the Wang method executed in Mothur with SILVA database. The ITS2 reads were assigned at the genus level using the massBLASTer algorithm in UNITE database (<https://unite.ut.ee/analysis.php>) with an E-value superior at 10^{-60} and an identity superior to 95%.

Data selection

The interpretation of the results of the microbial biodiversity at the genus rank, we selected the 10 most present genera in each samples, deleted the duplication and represented the selected genera in a heat map drawn using Origin pro 2017.

RESULTS

Sampling conditions

Environmental conditions (temperature and humidity) were monitored during the sampling time at each point (table S5). The temperature varied from 5°C to 27°C depending on the month and the sampling location. It was warmer in the indoor reference especially in cold season (about 20°C). In the waste-exposed area, the lowest temperatures were observed in the hall (unloading waste area, shredder and press/storage). In the two cabins, the temperature was higher than in the hall but lower than the indoor reference. More generally, the temperatures were low in winter (<15 °C), intermediate in spring and in fall (15-20°C) and warm in summer (>20°C). The relative humidity varied from 40% to 60% for all the sampling periods and sampling points.

General sequencing data

During the twelve sampling days, 72 bioaerosol samples were collected for microbial biodiversity analysis. Bacterial biodiversity was assessed by sequencing 63 samples and the fungal biodiversity by sequencing 68 samples representing 87% and 94% respectively of the collected bioaerosols. Most of the non-sequenced samples were collected in the winter or at the indoor reference and showed low DNA concentrations which were under the detection limit ($3 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) claimed by the provider (table 6). The number of reads after the sequencing varied in a wild range depending on the location and on the month of the sampling. The median of the reads was about 20-30 thousands except for 16S rDNA reads at the indoor reference which contained less reads than the others sampling locations. Two samples showed a very low bacterial reads number sampled near the press in November and in the indoor reference in September.

Table 6 Overview of high-throughput sequencing data obtained from bioaerosol samples taken in the WSP during the year of sampling.

	Sampling point	Median of reads number	Min of reads number	Max of reads number	Number of sequenced samples	Month of non-sequenced samples
Bacteria^a	Unloading area	31,282	15,290	35,073	12	None
	First-sorting cabin	30,393.5	4,918	42,222	12	None
	Sorting cabin	33,875	1,581	37,463	10	February, November
	Shredder	33,467	2,660	39,888	11	November
	Press/storage	28,075	153	40,098	11	February
	Indoor reference	2,078	37	22,105	7	February, June, July, November, December
Fungi^b	Unloading area	26,894	19,552	46,777	12	None
	First-sorting cabin	30,346	16,681	44,581	12	None
	Sorting cabin	23,309.5	12,199	49,119	12	None
	Shredder	25,825.5	12,583	47,207	12	None
	Press/storage	26,144	12,934	43,240	11	March
	Indoor reference	23,477	12,325	52,283	8	February, March, July, October

^a sequencing of a region of 16S rDNA^b sequencing of ITS2 region

Bacterial biodiversity

Dominant bacterial phyla and their variation

Most of the bacterial reads were assigned; the median of “Bacteria_unclassified” was 1.2% (maximal 20.4% in February in the first-sorting cabin) and in the sorting activities and 8.4% in the indoor reference (figure 21). Thirty bacterial phyla were observed but 96% of the reads represented the five most prominent phyla in all the samples: Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes and Proteobacteria (total of the 5 phyla relative abundance: min= 79% in the waste-exposed locations and 77% in the indoor reference). Among these 5 main phyla, Firmicutes and Proteobacteria were the two dominant phyla at the waste-exposed locations (median=41.5% and 24.6% respectively) and in the indoor reference (median= 20.0% and 48.6% respectively). Actinobacteria and Bacteroidetes were also two phyla present in significant proportions. They were in higher proportions inside the waste-exposed locations, 11.0% for Actinobacteria and 14.4% for Bacteroidetes than in the indoor reference (2.0% and 6.5% respectively). The median of Cyanobacteria was 2.1% inside the activities and 0.8% in the indoor reference.

The proportions of all the main phyla varied at each point during the year and depending on the sampling locations. This observation is illustrated in the figure 21 for three sampling locations: unloading waste area, in the first-sorting cabin and in the indoor reference (for the other sampling points, see figure S3 in the supplementary materials). The relative abundance of the Firmicutes represented until 57.0% of the bacterial reads (in June in the first-sorting cabin) and the Proteobacteria up to 80.2% (in April in the sorting cabin). The Cyanobacteria were in a high proportion in February in the unloading waste area with 65.7% of the bacterial reads assigned to this

phylum. This value was not expected and had not been found in the others locations nor at any time during the sampling campaign.

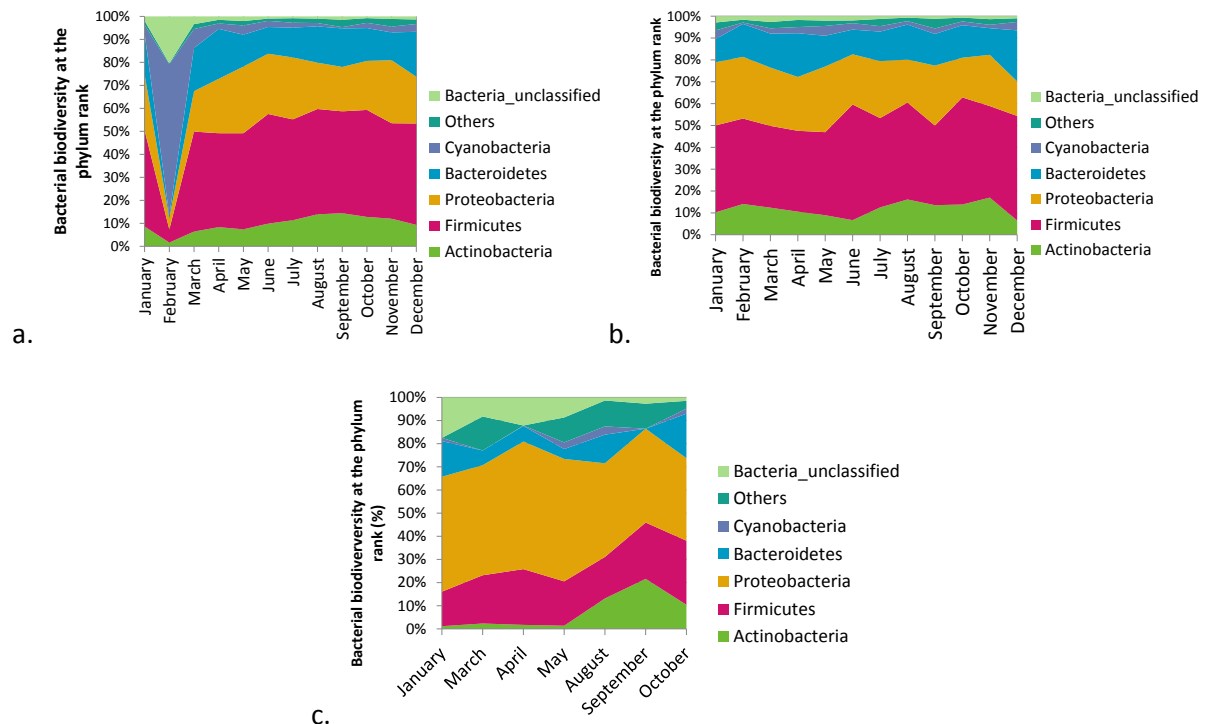


Figure 21 Bacterial biodiversity at the phylum level in the samples collected in :a. the waste unloading area, b. in the first-sorting cabin, c. in the non-exposed indoor reference.

Dominant bacterial genera and their variation

At the genus rank, a total of 605 bacterial genera were observed in all combined samples. After trimming and selection of the ten most dominant genera in each samples, 57 bacterial genera remained. Among the 57 predominant genera, there were 8 Actinobacteria, 11 Bacteroidetes, 17 Firmicutes, 1 Nitrospinae, 19 Proteobacteria and 1 Verrucomicrobia genera. The main genera represented from 9.3% (waste unloading area in February) to 83.8% (indoor reference in September) of the bacterial reads. The main genus at each sampling point, including the indoor reference, was *Staphylococcus* (figures 22 and S4). The median proportion of *Staphylococcus* was nearly the same in the indoor reference and waste-exposed locations (about 9%) but it represented up to 49% of the bacterial reads near the press (in March) whereas its maximal proportion was 8.4% in the indoor reference.

As for the bacterial phyla, the proportions and the number of the bacterial genera varied depending on the locations of sampling in one hand and on the sampling period in another one (figure 22). Because of the biodiversity complexity, the further results description will be focused on three sampling points: the unloading waste area, the first-sorting cabin and the indoor reference (for the other results, see figure S4). To facilitate the reading, the figure 22 represents only the 45 main genera present in a proportion superior than 0.3%. *Prevotella* and *Pseudomonas* were present during all the year in subsequent proportion in the two waste-exposed locations (about 3%) and in less proportion in the indoor reference (less than 0.6%). *Streptococcus* was also found every month but in lower proportion (1.5%, 1.2% and 3.0% in the unloading waste area, the first-sorting cabin and the

indoor reference respectively) with a maximal value of 11.3%, observed in the indoor reference in January. Other bacterial genera were frequently found during the year in the bioaerosols collected in the unloading area and in the first sorting cabin: *Lactobacillus* (3%), *Bacillus* (1%), *Leuconostoc* (2%) which was absent in the indoor reference but also *Aerococcus*, *Lactococcus*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium* and so on. The bioaerosol sampled in the unloading waste area in February had a different composition with a high proportion of the Cyanobacteria taxon: “Chloroplast_unclassified” (65.7%).

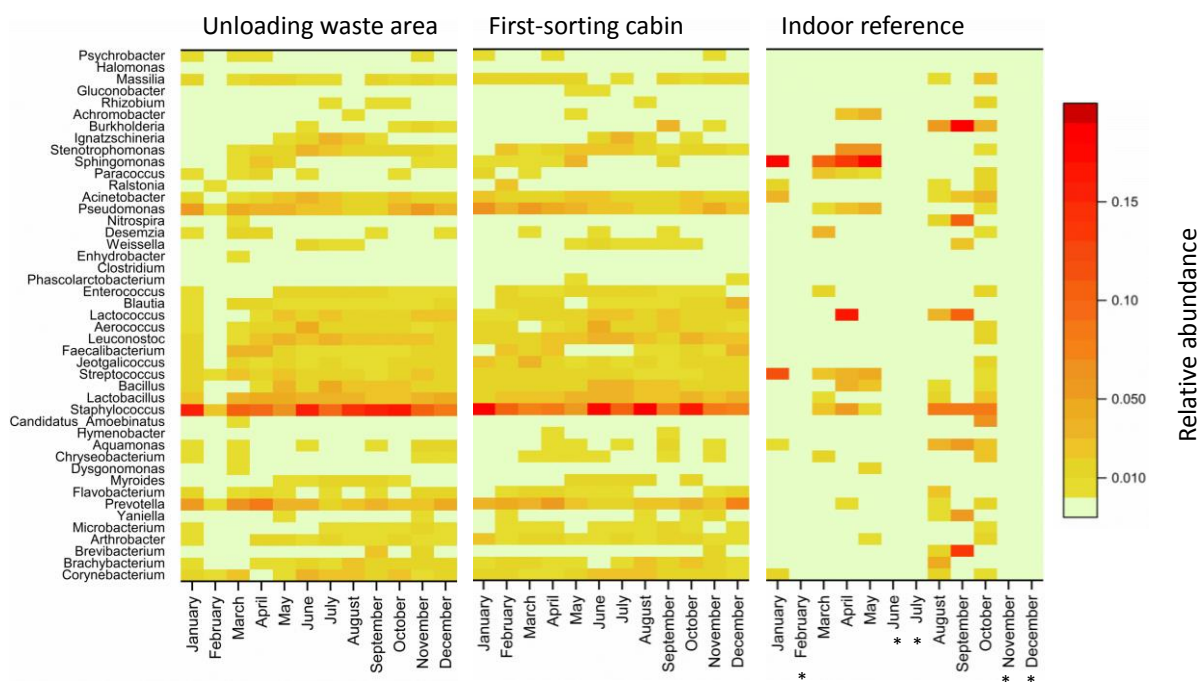


Figure 22 Bacterial biodiversity at the genus level in bioaerosols collected in the unloading waste area, in the first-sorting cabin and in the indoor reference (* no data collected for the samples).

Fungal biodiversity

Dominant fungal phyla and their variation

As for bacterial biodiversity, most of the fungal reads were assigned with a median value of “Fungi_unclassified” of 3% with an extreme and unusual value at 17.2% in September at the unloading waste sorting area. Among the 6 phyla detected in the bioaerosols, Ascomycota, Basidiomycota and Mucoromycota were the dominant ones. Ascomycota reads represented more than 50% of the fungal reads (56.3% waste-exposed locations and 53.2 in the reference). There were 34.6% and 40.2% of Basidiomycota reads inside the activities and in the reference respectively. The Mucoromycota phylum was less observed with 1.1% of Mucoromycota reads for waste treatment locations. This phylum was in little relative abundance in the reference (0.050%) with a maximal observed in April (3.2%).

The main fungal phyla were present at every time and at each sampling points but their proportions varied depending on the place and the time of the samples collection. These variations were demonstrated in the figures 23 and S5.

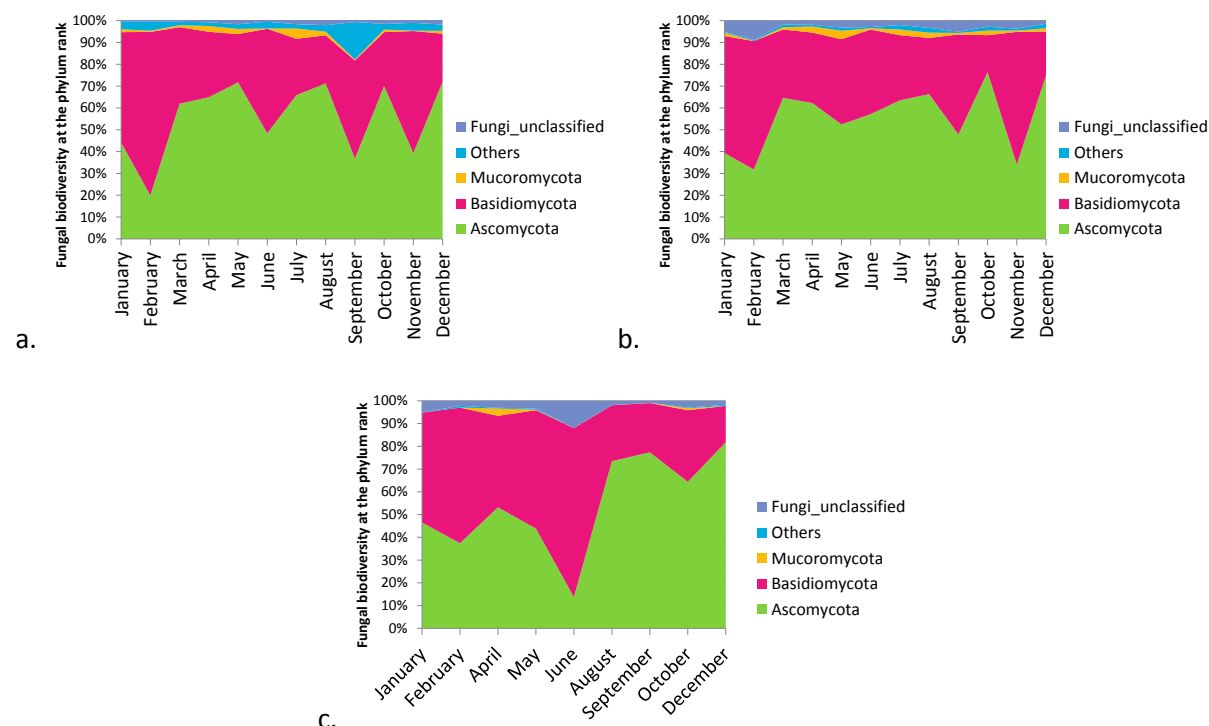


Figure 23 Fungal biodiversity at the phylum rank in bioaerosols collected in: a. the unloading waste area, b. in the first sorting cabin, c. in the non-exposed indoor reference.

Dominant fungal genera and their variation

A total of 592 fungal genera were identified considering all the samples. Among them, 52 genera (25 Ascomycota, 25 Basidiomycota and 2 Mucoromycota) constituted the main genera. They varied from 58.7% (October near the press) to 91.2 % (January in the first-sorting cabin) (med=77.2%).

The variations the relative abundance of the main fungal genera found in the unloading waste area, the first-sorting cabin and the indoor reference are described in the figure 24. The fungal biodiversity found in the sorting cabin, near the shredder, near the press was illustrated in the figure S4 in the supplementary materials. On the 52 main genera, 46 were founded in huge proportions all the year: *Cladosporium*, *Alternaria*, *Debaryomyces*, *Penicillium*, *Candida*, *Wallemia*, *Cryptococcus* and *Mucor* (figure 24). *Wallemia* was the predominant genus in the two occupational sampling points. It was representing 17.3% (until 66.4% in February) and 21.4% (until 54.8% in November) of the ITS2 reads in the unloading waste area and in the first sorting cabin respectively. In the indoor reference, *Wallemia* was also in subsequent proportion (6.5%) with a maximum equivalent to the two other points (57.7% in June). *Cladosporium* and *Debaryomyces* were also dominant genera found at the three sampling locations along the year. *Cladosporium* was the predominant genus in the indoor reference. In the unloading waste area and in the first-sorting cabin, 5% of fungal reads were assigned to *Penicillium* and *Candida* (5.2% and 6.1% in the unloading waste area; 5.2% and 4.5% in the first-sorting cabin). These two genera represented only 1% in the indoor reference. *Aspergillus* was present in low proportions from January to June. Its proportion increased from July to reach 3.7% in the unloading waste area and 4.1% in the first-sorting cabin in August. *Aspergillus* proportions remained lower all the year in the indoor reference.

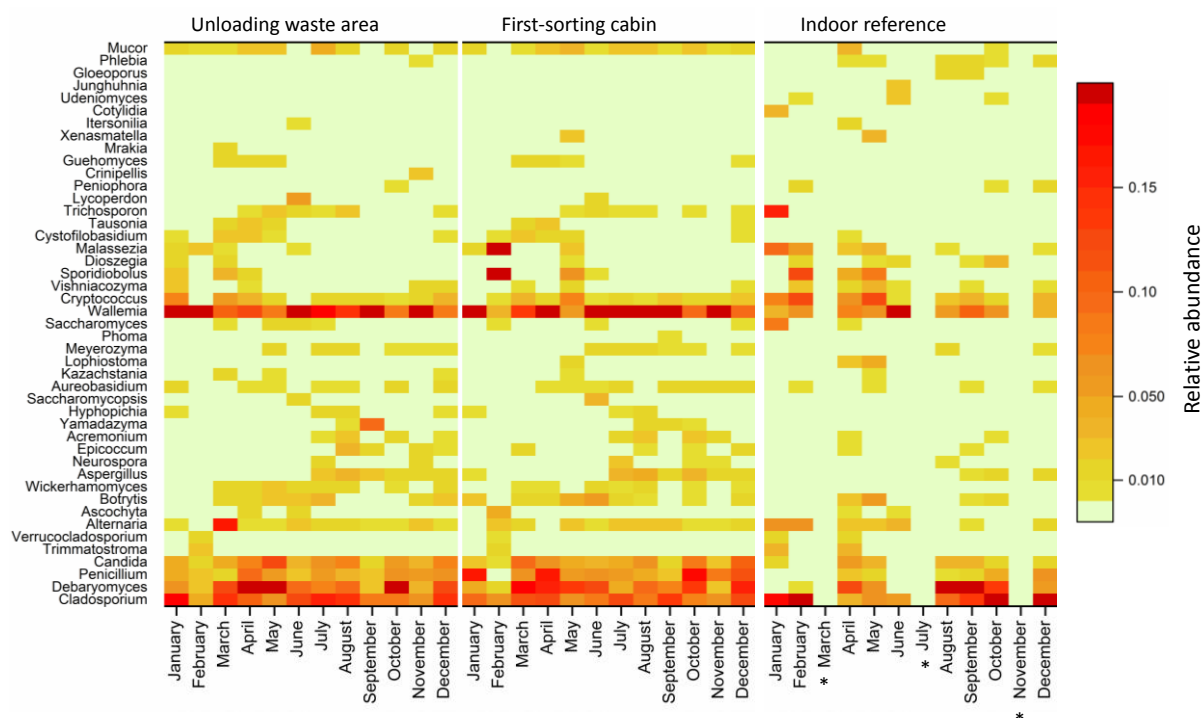


Figure 24 Fungal biodiversity at the genus level in bioaerosols emitted in: the unloading area, the first-sorting cabin and in the indoor reference (* no data collected for the samples).

DISCUSSION

Overview of the sampling campaign

During the sampling campaign, the climatic conditions were typical of those of the semi-continental climate usually found in the North East of France. The WSP had an activity and a number of workers which were similar to the ones of previous years with an increase of the amount of sorted wastes. No production dysfunctions were monitored during sampling periods except a production stop in November with any activity in the two sorting cabins. Thus, the overall production as well as working activities was considered to be representative of usual ones for the investigated WSP.

Dominant airborne microorganisms in the WSP

The biodiversity data revealed that some microbial taxa were present in subsequent proportions all along the year and at all the sampling locations. For bacteria, the Firmicutes was the dominant bacterial phylum followed by Proteobacteria and Bacteroidetes (with an exception for the unloading waste area in February). About 605 bacterial genera were found but only few of them (about 50) account for the most of the 16S rDNA reads in collected bioaerosol samples. Among these genera, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Lactococcus* were almost present and dominant all along the year and at each sampling point. For fungi, dominant phyla were Ascomycota and Basidiomycota and only few genera represented the most of ITS2 reads as compared to bacteria. Indeed, the genera *Wallemia*, *Cladosporium*, *Debaryomyces*, *Candida* and *Penicillium* accounted for 12% to 83% (median= 54%) in the plant. Therefore, among the 592 fungal genera, only five genera constituted more than half of the relative abundance of the ITS2 reads.

As already pointed out; data about the bacterial and fungal biodiversity in bioaerosols from WSPs are scarce. Indeed, most of biodiversity data from studies carried in WSP were obtained by culture of microorganisms followed by macroscopic and/or microscopic identification as well as biochemical identification. Furthermore, the biodiversity in bioaerosols has been far less documented for bacteria than for fungi. We have recently published the first results of biodiversity in bioaerosols from measurements in a WSP using NGS methods (Degois *et al.*, 2017).

These results corroborate previous findings from a study in a waste sorting plant using NGS technologies where dominant bacteria phyla were Firmicutes and Proteobacteria and fungal ones were Ascomycota and Basidiomycota (Degois *et al.*, 2017). In this previous study, the same bacterial (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* and *Lactococcus*) and fungal (*Penicillium* and *Aspergillus*) genera were also found predominantly. The same bacterial genera were also isolated and considered as predominant ones in different environments and using cultural methods. For example, *Staphylococcus* was isolated from samples collected in truck cabs for waste collection by colonies identification using MALDI-TOF (Madsen *et al.*, 2016). *Staphylococcus* and *Bacillus* were found by culture in bioaerosols emitted during paper sorting plant (Breum *et al.*, 1999). In the present study, the genus *Prevotella* was also found in an important relative abundance all along the year. To our knowledge, this genus was not reported in study measuring the bacterial composition in bioaerosol emitted in waste sorting plant. These fungal genera *Penicillium* and *Aspergillus* were also isolated by culture from samples collected in truck cab samples (Madsen *et al.*, 2016), in a waste treatment plant (Breum *et al.*, 1999; Tolvanen 2001; Lehtinen *et al.*, 2013; Viegas *et al.*, 2014). In addition with *Penicillium*, *Cladosporium* was the predominant fungal genus in a sorting paper plant (Breum *et al.*, 1999) and *Candida* was found in high proportion, using NGS, in a domestic composts and in bioaerosols from which they are produced (Mbareche *et al.*, 2017). The results indicate that *Wallemia* was the predominant fungal genus found in the bioaerosols. Indeed, *Wallemia* was not found by culture in bioaerosols in previous studies published and was detected using NGS methods in a lower relative abundance (Degois *et al.*, 2017). The NGS provided higher biodiversity records than the culture-dependent methods that were discussed in a previous study (Degois *et al.*, 2017).

The differences found in microbial biodiversity might be explained by different factors including the methods used biodiversity measurements, the geographic and climatic conditions (Smets *et al.*, 2016). The *Wallemia* genus was isolated from indoor air, food even in food with low water activity, and salty environment. It is a xerophilic fungi and only one species, *Wallemia sebi*, growth on media as MEA without solutes addition (Zalar *et al.*, 2005). Therefore, the detection and the abundance of this genus can be underestimated using culture-dependent methods. *Wallemia* was also isolated from fine particles in outdoor samples collected in Germany (Fröhlich-Nowoisky *et al.*, 2009). Surprisingly the genus *Aspergillus* was poorly detected in the present study regarding to a previous sampling campaign and others studies. Indeed, *Aspergillus* was found as a predominant genus in several studies (Tolvanen 2001; Viegas *et al.*, 2014; Degois *et al.*, 2017). This fact may be due to the few relative abundance of the genus *Aspergillus* in the WSP investigated compared to the others sites. It also may due to a methodological bias such as a lack of DNA extraction of this specific genus. Indeed, an experimental precedent work showed a bad efficiency of the MPBio kit to extract *Aspergillus* DNA (data not shown). In general, it is admitted that a unique DNA extraction method do not enable the extraction of the whole diversity by the same way (Manian *et al.*, 2001; Fredricks *et al.*, 2005; Karakousis *et al.*, 2006).

Thus, the study provides additional biodiversity data about bioaerosols emitted in WSP and reveals their real complex composition all along the year.

Reported health disorders of the found microbial taxa

Several of the dominant microbial genera found in the present study include species that were involved in health disorders among general and occupational populations. For example, some *Prevotella* species were involved in human health disorders as pulmonary diseases and chronic otitis and sinusitis (Tanaka *et al.*, 2008). The effects of airborne fungal particles are well described in the literature. The risk due to airborne fungal particles is better described than bacterial risk. Fungi can induce different type of effects: allergy (asthma, rhinitis or hypersensitivity pneumonitis), toxicity (mycotoxins exposure), and irritation or infection. Airborne *Cladosporium*, *Aspergillus* and *Penicillium* exposition was related with allergic skin disease as contact dermatitis (Kallawicha *et al.*, 2016) and are volatile organic compound producers which cause several symptoms such as dry cough, pharyngitis... What's more, the wall cell of *Aspergillus* and *Candida ssp.* are composed by mannan which is a known allergic compound (Dyląg 2017). Furthermore, *Wallemia sebi* is involved in allergenic disorders such as the farmer's lung disease and produces a toxic metabolite, the wallemiol with had the same effect as the mycotoxin, penicillic acid (Wood *et al.*, 1990).

Furthermore, because of the high number of genus, only the main genera were represented on the figures. However, as the dose/response relationship was not established, the minor and the rare taxa could have an effect on worker health. What is more, the pathogenic property is not the only aspect. Indeed, the bacteria presented in low proportions can carry endotoxins or β -D-glucans. Exposures to these compounds were reported in waste treatment plants in other studies (Tolvanen 2001; Lehtinen *et al.*, 2013). These components are described in the literature to induce several health effects as irritation of the upper airways or mucous membranes, inflammation for the glucans (Bønløkke *et al.*, 2006; Ławniczek-Wałczyk and Górny 2010) and irritation of the respiratory system, fever, diarrhea (Rylander *et al.*, 1985; Duquenne *et al.*, 2012; Balty *et al.*, 2015).

On the other hand, the biodiversity data provided by the present study are not sufficient for an eligible risk assessment in the WSP. First, the dose/response relationship between airborne microorganism exposure and human health disorders was not well established yet (Walser *et al.*, 2015). Secondly, individual samplings are required for the assessment of occupational exposure. Indeed, the stationary sampling did not consider the movement of the workers during the shift. Finally, the NGS technologies do not allow the identification at the species level due to the short reads provided by the Illumina sequencing or to the errors of sequence annotations in databases (Nilsson *et al.*, 2006; Yamamoto and Bibby 2014). The genus level does not allow a precise risk assessment. Indeed, a genus can gather a large number of species; more than an hundred for the genus *Bacillus* and within a genus, only some species can be pathogenic as *Staphylococcus aureus* for the *Staphylococcus* genus (Kwok *et al.*, 1999).

The NGS allows in a first step to characterize the entire genus to in a second step, focusing on specific genera with another method to assess the microbial exposure at the species level. The global sequencing using PacBio technology allows identification at the species level thanks to longer sequenced reads (1000 pb) (Rhoads and Au 2015).

Variation of microbial biodiversity over time

To study the variation of microbial biodiversity, 72 bioaerosol samples were collected over twelve months at five waste-exposed points and in an indoor reference. Finally, 63 bacterial compositions and 68 fungal compositions were assessed. Consequently, the sampling measurement strategy provided information about the microbial biodiversity found in different conditions during one year to monitor the potential community variation.

Results revealed a temporal and a spatial variation of the number of microbial taxa (bacteria and fungi) as well as their proportions (at the phylum, class, order and genus levels) providing the first record of such variations of biodiversity in bioaerosols emitted in WSP. Thus the bioaerosols emitted in the waste sorting plant had a complex composition that varied over time. These results are in agreement with previous studies showing a variation in time of microbial biodiversity observed in five swine houses in South Korea (Kumari *et al.*, 2016) and in indoor air (Adams *et al.*, 2013; Emerson *et al.*, 2016). All the studies reported important variations and a high complexity of the bioaerosols emitted in the different environments.

The biodiversity was closer between the sampling points in the plant than in the non-exposed indoor. Moreover, the environmental parameters (temperature, relative humidity) and the amount of sorted waste also varied in regard with the period of sampling. The environmental conditions can impact the concentrations of fungi and bacteria in bioaerosols emitted during waste handling (Park *et al.*, 2013) but also impact the biodiversity in bioaerosols. We were not able to collect information about the precise nature of the sorted wastes, their microbial content and the duration of waste storage in the plant before being sorted because of the plant organization. However, several studies reported that the nature of wastes or the duration of the bin storage may increase the level of airborne microorganisms (Schlosser *et al.*, 2015; Gladding and Gwyther 2017).

The high complexity and variability of the bioaerosols in waste sorting plants may explain why published epidemiological studies did not clearly establish the impact of airborne microorganisms on worker's health.

Significance of findings on sampling strategy for biodiversity monitoring

The bacterial biodiversity is less investigated than the fungal biodiversity in waste treatment plants. The exposure to airborne bacteria is generally assessed by measuring the concentration of culturable bacteria or determining the endotoxin level exposure (Tolvanen 2001; Lehtinen *et al.*, 2013). However, an experimental study showed that bacteria were present in higher abundance than fungi and that they represented the most colonizers of the household waste bins (Gladding and Gwyther 2017). So, investigating bacterial biodiversity is needed for a better understanding of airborne microorganism exposures in WSP.

Moreover, because of the high bioaerosol complexity, a long monitoring survey is appropriate to an accurate assessment of bioaerosol composition. Indeed, a unique sampling may induce misinterpretation about the occupational exposure. Thus, a single sample collected in specific environmental conditions and at a specific time can induce a misinterpretation of the bioaerosol composition and under or overestimate the biological exposure. That is why; the collection of several bioaerosol samples is required to characterize the bioaerosol biodiversity and to get a representative overview of the bioaerosol composition.

Perspectives of the study

While providing useful data for a better understanding of the microbial biodiversity in bioaerosols emitted in waste sorting plant, the present study had some limitations. The temporal variation was assessed by only one sample per month it is not necessarily representative of the month. The study could be amended by shorter scale-time investigations. Further measurements could be done in other WSPs with different organizations (levels of automation, ventilation system or household waste instructions etc.) which could affect the microbial bioaerosol composition. The new biodiversity data provided by the study allow the further specific quantification of main microbial genera and to focus on the identification of species belonging these genera.

NGS methods have also limits and biases due to DNA extraction efficiency, the bioinformatics steps such as chimera removing, sequences clustering in operational taxonomic unit (OTU) or the OTU labeling (Bellemain *et al.*, 2010; Mbareche *et al.*, 2017). The NGS and more generally molecular biology methods are blamed to not considerate the viability aspect of the microorganisms and thus overestimating the biological risk and more especially the infectious risk (Mbareche *et al.*, 2017).

CONCLUSION

The study allowed the characterization of the microbial biodiversity in a waste sorting plant during one year. The results revealed a real complexity in the composition of bioaerosols emitted at occupational settings in the WSP. Indeed, the identified bacterial communities were dominated by the Firmicutes and the Proteobacteria with *Staphylococcus* and *Pseudomonas* while as dominant genera. *Wallemia*, *Cladosporium*, *Candida*, *Debaryomyces* and *Penicillium* accounted for the main genera composing the airborne fungal communities. The NGS biodiversity data showed higher biodiversity records as compared with the previously published ones measured with the culture-dependent methods and brings new insights about bacterial and fungal biodiversity in bioaerosols emitted in WSPs.

Furthermore, the study showed a temporal and a spatial variation of the number and proportion of microbial taxa at the phylum and genus ranks, which constitute the first report of variations of biodiversity in bioaerosols emitted in WSPs. These results also suggest that sampling strategies would include the collection of several samples for an accurate and representative assessment of biodiversity in occupational environments. They these results highlight that waste sorting workers are likely exposed to airborne microbial communities of varying composition and pathogenicity over time.

The findings also encourage the further specific quantification of target bacterial and fungal taxa by qPCR in WSP bioaerosols to improve the quantitative exposure assessments in this sector. On the other hand, further statistical analysis of NGS data are needed to investigate factors determining the composition of airborne microbial communities in WSPs and to better understand the origins of its variation. This would improve the understanding of biological risks in this working environment.

REFERENCE

- Adams, R. I., Miletto, M., Taylor, J. W., Bruns, T. D. (2013). Dispersal in microbes: fungi in indoor air are dominated by outdoor air and show dispersal limitation at short distances. *The ISME Journal* 7: 1262-1273.
- ADEME (2015). Les installations de traitement des ordures ménagères en France: données 2012: 1-20.
- Arfi, Y., Marchand, C., Wartel, M., Record, E. (2012) Fungal diversity in anoxic sulfidic sediments in a mangrove soil. *Fungal Ecol* 5: 282-285.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* 10: 189.
- Bønløkke, J., Stridh, G., Sigsgaard, T., Kjaergaard, S., Löfstedt, H., Andersson, K., Bonefeld-Jørgensen, E., Jayatissa, M., Bodin, L., Juto, J., Mølhave, L. (2006). Upper-airway inflammation in relation to dust spiked with aldehydes or glucan. *Scandinavian journal of work, environment and health* 32: 374-382.
- Breum, N. O., Würtz, H., Midtgaard, U., Ebbehøj, N. (1999). Dustiness and bio-aerosol exposure in sorting recyclable paper. *Waste Management and Research* 17: 100-108.
- Council of the European Union, 2008. Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 on waste and repealing certain directives. *Official Journal of the European Union* (Brussels).
- Degois, J., Clerc, F., Simon, X., Bontemps, C., Leblond, P., Duquenne, P. (2017). First metagenomic survey of the microbial diversity in bioaerosols emitted in waste sorting plants. *Annals of Work Exposures and Health*. 61:1076-1086.
- Ding, W., Li, L., Han, Y., Liu, J., Liu, J. (2016). Site-related and seasonal variation of bioaerosol emission in an indoor wastewater treatment station: level, characteristics of particle size, and microbial structure. *Aerobiologia* 32: 211-224.
- Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D. (2003). Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Annals of Occupational Hygiene* 47: 187-200.
- Duquenne, P., Marchand, G., Duchaine, C. (2013). Measurement of endotoxins in bioaerosols at workplace: a critical review of literature and a standardization issue. *Annals of Occupational Hygiene* 57:137-172.
- Dyląg, M. (2017). Fungi present in home and their impact on human health-A short review. *Insights in Biology and Medicine* 1: 16-25.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194-2200.
- Emerson, J. B., Keady, P. B., Clements, N., Morgan, E. E., Awerbuch, J. S., Miller, L., Fierer, N. (2016). High temporal variability in airborne bacterial diversity and abundance inside single-family residences. *Indoor air* 27: 576-586.
- Fredricks, D. N., Smith, C., Meier, A. (2005). Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 5122-5128.
- Fröhlich-Nowoisky, J., Pickersgill, D. A., Després, V. R., Pöschl, U. (2009). High diversity of fungi in air particulate matter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 12814-12819.
- Giusti, L. (2009). A review of waste management practices and their impact on human health. *Waste Management* 29: 2227-2239.
- Gladling, T. L., Gwyther, C. L. (2017). A study of the potential release of bioaerosols from containers as a result of reduced frequency residual waste collections. *Science of The Total Environment* 576: 481-489.
- Heldal, K. K., Halstensen, A. S., Thorn, J., Djupesland, P., Wouters, I., Eduard, W., Halstensen, T. S. (2003). Upper airway inflammation in waste handlers exposed to bioaerosols. *Occupational and Environmental Medicine* 60: 444-450.
- Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486:207-214.
- Kallawicha, K., Chuang, Y.-C., Lung, S.C.C., Han, B.-C., Ting, Y.F., Chao, H. J. (2016). Exposure to ambient bioaerosols is associated with allergic skin diseases in Greater Taipei residents. *Environmental Pollution* 216: 845-850.
- Karakousis, A., Tan, L., Ellis, D., Alexiou, H., Wormald, P. J. (2006). An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *Journal of Microbiological Methods* 65: 38-48.
- Kwok, A. Y. C., Su, S. C., Reynolds, R. P., Bay, S. J., Av-Gay, Y., Dovichi, Chow, A. W. (1999). Species identification and phylogenetic relationships based on partial HSP60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49: 1181-1192.
- Kumari, P. and Choi, H. (2015). Manure removal system influences the abundance and composition of airborne biotic contaminants in swine confinement buildings. *Environmental Monitoring and Assessment* 187: 1-10.
- Kumari, P., Woo, C., Yamamoto, N., Choi, H.L. (2016). Variations in abundance, diversity and community composition of airborne fungi in swine houses across seasons. *Scientific Reports* 6: 37929.

- Lavoie, J., Dunkerley, C. J., Kosatsky, T., Dufresne, A. (2006). Exposure to aerosolized bacteria and fungi among collectors of commercial, mixed residential, recyclable and compostable waste. *Science of The Total Environment* 370: 23-28.
- Ławniczek-Wałczyk, A. and Górny, R. (2010). Endotoxins and β -glucans as markers of microbiological contamination--characteristics, detection, and environmental exposure. *Annals of agricultural and environmental medicine* 17: 193-208.
- Lehtinen, J., Tolvanen, O., Nivukoski, U., Veijanen, A., Hänninen, K. (2013). Occupational hygiene in terms of volatile organic compounds (VOCs) and bioaerosols at two solid waste management plants in Finland. *Waste Management* 33: 964-973.
- Lin, W., Yu, Z., Zhang, H., Thompson, I. P. (2014). Diversity and dynamics of microbial communities at each step of treatment plant for potable water generation. *Water Research* 52: 218-230.
- Madsen, A. M., Alwan, T., Ørberg, A., Uhrbrand, K., Jørgensen, M. B. (2016). Waste workers' exposure to airborne fungal and bacterial species in the truck cab and during waste collection. *Annals of Occupational Hygiene* 60: 651-668.
- Manian, S., Sreenivasaprasad, S., Mills, P. R. (2001). DNA extraction method for PCR in mycorrhizal fungi. *Letters in Applied Microbiology* 33: 307-310.
- Mbareche, H., Brisebois, E., Veillette, M., Duchaine, C. (2017). Bioaerosol sampling and detection methods based on molecular approaches: No pain no gain. *Science of The Total Environment* 599: 2095-2104.
- Mbareche, H., Veillette, M., Bonifait, M. E., Dubuis, L., Benard, Y., Marchand, G., Bilodeau, G. J., Duchaine, C. (2017). A next generation sequencing approach with a suitable bioinformatics workflow to study fungal diversity in bioaerosols released from two different types of composting plants. *Science of The Total Environment* 601: 1306-1314.
- Nehme, B., Létourneau, V., Forster, R. J., Veillette, M., 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: 665-675.
- Nilsson, R. H., Ryberg, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Larsson, K.-H., Kõljalg, U. (2006). Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLoS ONE* 1: e59.
- Park, D., Ryu, S., Kim, S., Byun, H., Yoon, C., Lee, K. (2013). Airborne bacteria and fungi associated with waste-handling work. *International Journal of Occupational and Environmental Health* 19: 311-318.
- Perez, H. R., Frank, A. L., Zimmerman, N. J. (2006). Health effects associated with organic dust exposure during the handling of municipal solid waste. *Indoor and Built Environment* 15: 207-212.
- Quaiser, A., Zivanovic, Y., Moreira, D., López-García, P. (2011) Comparative metagenomics of bathypelagic plankton and bottom sediment from the Sea of Marmara. *ISME J* 5: 285-304.
- Reinthal, F. F., Haas, D., Feierl, G., Schlacher, R., Pichler-Semmelrock, F. P., Köck, M., Wüst, G., Feenstra, O., Marth, E. (1999). Comparative investigations of airborne culturable microorganisms in selected waste treatment facilities and in neighbouring residential areas. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* 202: 1-17.
- Rhoads, A. and Au, K. F. (2015). PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 13: 278-289.
- Rylander, R., Haglund, P., Lundholm, M. (1985). Endotoxin in Cotton Dust and Respiratory Function Decrement among Cotton Workers in an Experimental Cardroom. *American Review of Respiratory Disease* 131: 209-213.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., et al (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7537-7541.
- Schlosser, O., Déportes, I. Z., Facon, B., Fromont, E. (2015). Extension of the sorting instructions for household plastic packaging and changes in exposure to bioaerosols at materials recovery facilities. *Waste Management* 46:47-55.
- Smets, W., Moretti, S., Denys, S., Lebeer, S. (2016). Airborne bacteria in the atmosphere: Presence, purpose, and potential. *Atmospheric Environment* 139: 214-221.
- Somboonna, N., Assawamakin, A., Wilantho, A., Tangphatsornruang, S., Tongsim, S. (2012). Metagenomic profiles of free-living archaea, bacteria and small eukaryotes in coastal areas of Sichang island, Thailand. *BMC Genomics* 13 Suppl 7: S29.
- Tanaka, S., Yoshida, M., Murakami, Y., et al. (2008). The relationship of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Prevotella melaninogenica* in the supragingival plaque of children, caries and oral malodor. *J Clin Pediatr Dent*. 32: 195–200.
- Tolvanen, O. K. (2001). Airborne bio-aerosols and noise in a dry waste treatment plant in Pietarsaari, Finland. *Waste Management & Research* 19: 108-114.
- Uroz, S., Ioannidis, P., Lengelle, J., Cébron, A., Morin, E., et al. (2013) Functional assays and metagenomic analyses reveals differences between the microbial communities inhabiting the soil horizons of a Norway spruce plantation. *PLoS One* 8: e55929.
- Viegas, C., Gomes, A. Q., Abegão, J., Sabino, R., Graça, T., Viegas, S. (2014). Assessment of fungal contamination in waste sorting and incineration—case study in Portugal. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 77: 57-68.

- Walser, S. M., Gerstner, D. G., Brenner, B., Bünger, J., Eikmann, T. et al (2015). Evaluation of exposure–response relationships for health effects of microbial bioaerosols – A systematic review. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 218: 577-589.
- Wood, G. M., Mann, P. J., Lewis, D. F., Reid, W. J., Moss, M. O. (1990). Studies on a toxic metabolite from the mould *Wallemia*. *Food Additives & Contaminants* 7: 69-77.
- Yamamoto, N. and Bibby, K. (2014). Clustering of fungal community internal transcribed spacer sequence data obscures taxonomic diversity. *Environmental Microbiology* 16: 2491-2500.
- Zalar, P., Sybren de Hoog, G., Schroers, H. J., Frank, J. M., Gunde-Cimerman, N. (2005). Taxonomy and phylogeny of the xerophilic genus *Wallemia* (Wallemiomycetes and Wallemiales, cl. et ord. nov.). *Antonie van Leeuwenhoek* 87: 311-328.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Table S 5 Temperature and relative humidity measured at each sampling points during the sampling campaign.

Month	Sampling point	Temperature	Relative humidity
January	Unloading waste area	0	ND
	First-sorting cabin	12	40
	Sorting cabin	12	41
	Shredder	0	ND
	Press/storage	ND	ND
	Indoor reference	19	37
February	Unloading waste area	5.6	48
	First-sorting cabin	ND	41
	Sorting cabin	ND	39
	Shredder	ND	47
	Press/storage	ND	50
	Indoor reference	ND	38
March	Unloading waste area	ND	ND
	First-sorting cabin	ND	ND
	Sorting cabin	ND	ND
	Shredder	ND	ND
	Press/storage	ND	ND
	Indoor reference	ND	ND
April	Unloading waste area	12	35.71
	First-sorting cabin	16	33.7
	Sorting cabin	19	32.29
	Shredder	13	35.75
	Press/storage	13	34.5
	Indoor reference	23	33.59
May	Unloading waste area	ND	ND
	First-sorting cabin	17	44.7
	Sorting cabin	ND	ND
	Shredder	14	44.15
	Press/storage	15	46.13
	Indoor reference	23	43.42
June	Unloading waste area	20	60.78
	First-sorting cabin	22	57.98
	Sorting cabin	21	60.53
	Shredder	20	60.63
	Press/storage	21	60.13
	Indoor reference	26	57.33
July	Unloading waste area	28	51.35
	First-sorting cabin	29	50.07
	Sorting cabin	28	47.88
	Shredder	27	52.05
	Press/storage	28	51.37
	Indoor reference	26	50.7
August	Unloading waste area	ND	ND
	First-sorting cabin	24	58.86
	Sorting cabin	22	59.22
	Shredder	22	59.5
	Press/storage	23	59.52

September	Indoor reference	24	54.38
	Unloading waste area	19	55.54
	First-sorting cabin	20	54.14
	Sorting cabin	21	52.79
	Shredder	19	55.12
	Press/storage	20	54.81
October	Indoor reference	27	50.4
	Unloading waste area	13	58.75
	First-sorting cabin	18	50.76
	Sorting cabin	19	53.58
	Shredder	14	54.76
	Press/storage	14	55.04
November	Indoor reference	21	50.21
	Unloading waste area	6	51.92
	First-sorting cabin	14	43.61
	Sorting cabin	18	41.45
	Shredder	6	52.19
	Press/storage	7	51.45
December	Indoor reference	21	38.83
	Unloading waste area	0	45.85
	First-sorting cabin	11	35.07
	Sorting cabin	11	37.08
	Shredder	1	44.84
	Press/storage	ND	ND
	Indoor reference	18	33.25

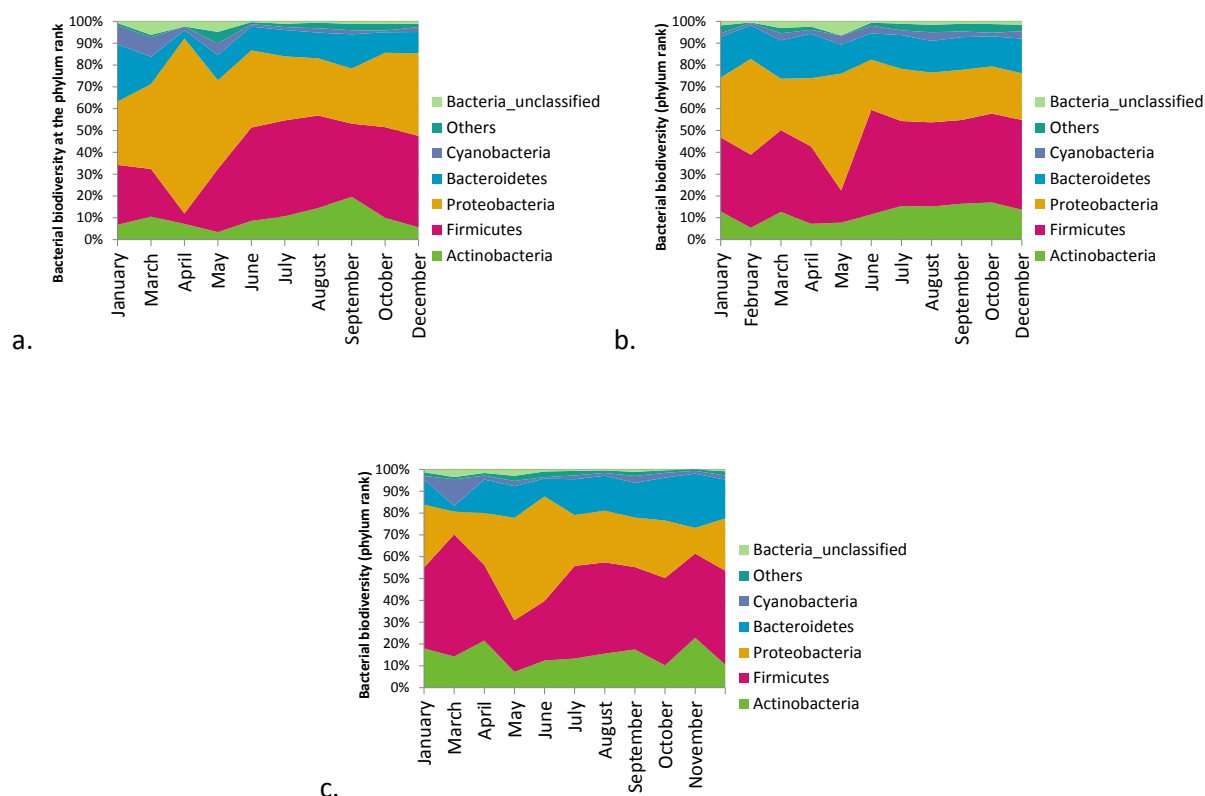


Figure S 4 Bacterial biodiversity at the phylum level in the samples collected in : a. the sorting cabin, b. near the press, c. near the press and the storage bales area.

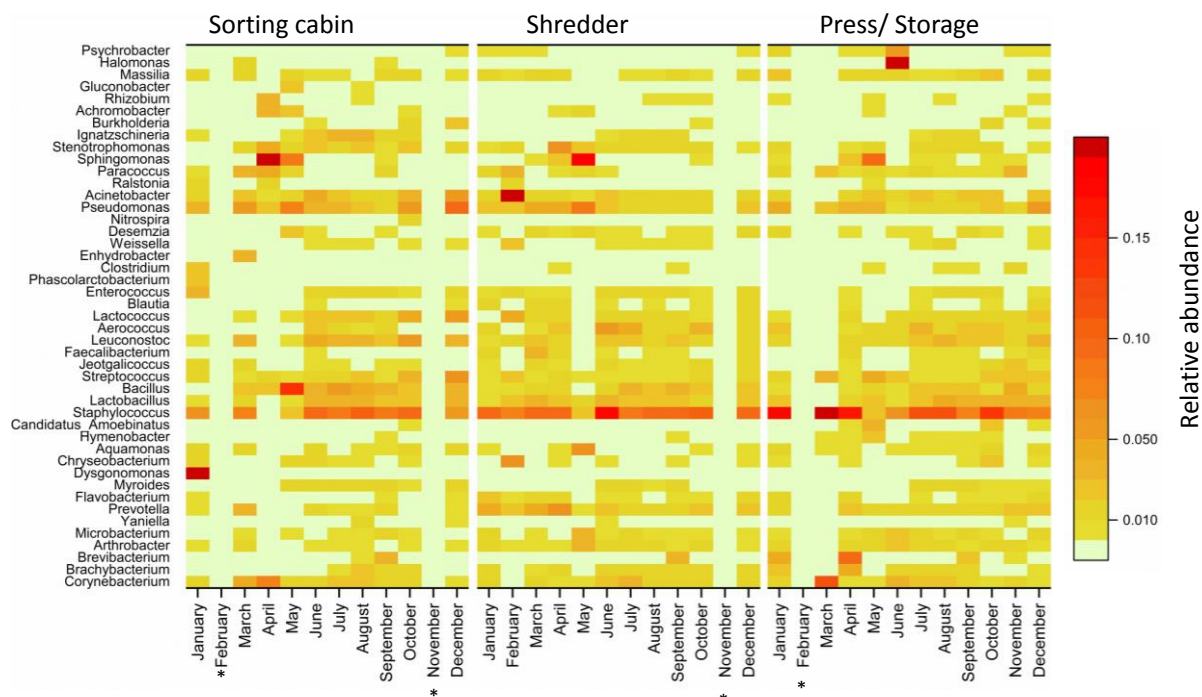


Figure S 5 Bacterial biodiversity in bioaerosols collected in the sorting cabin, near the shredder and near the press/ storage bales area (* no data collected for the samples).

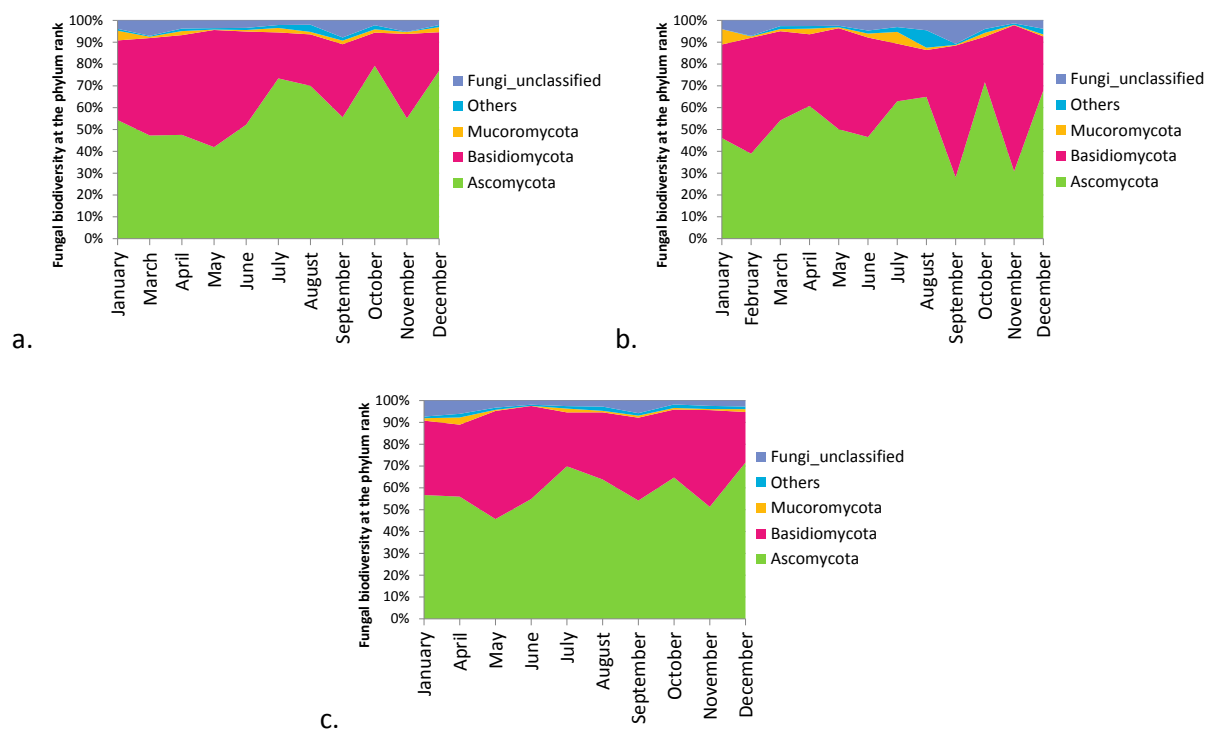


Figure S 6 Fungal biodiversity at the phylum rank in bioaerosols collected in: a. the sorting cabin, b. near the shredder, c. near the press and the bales storage area.

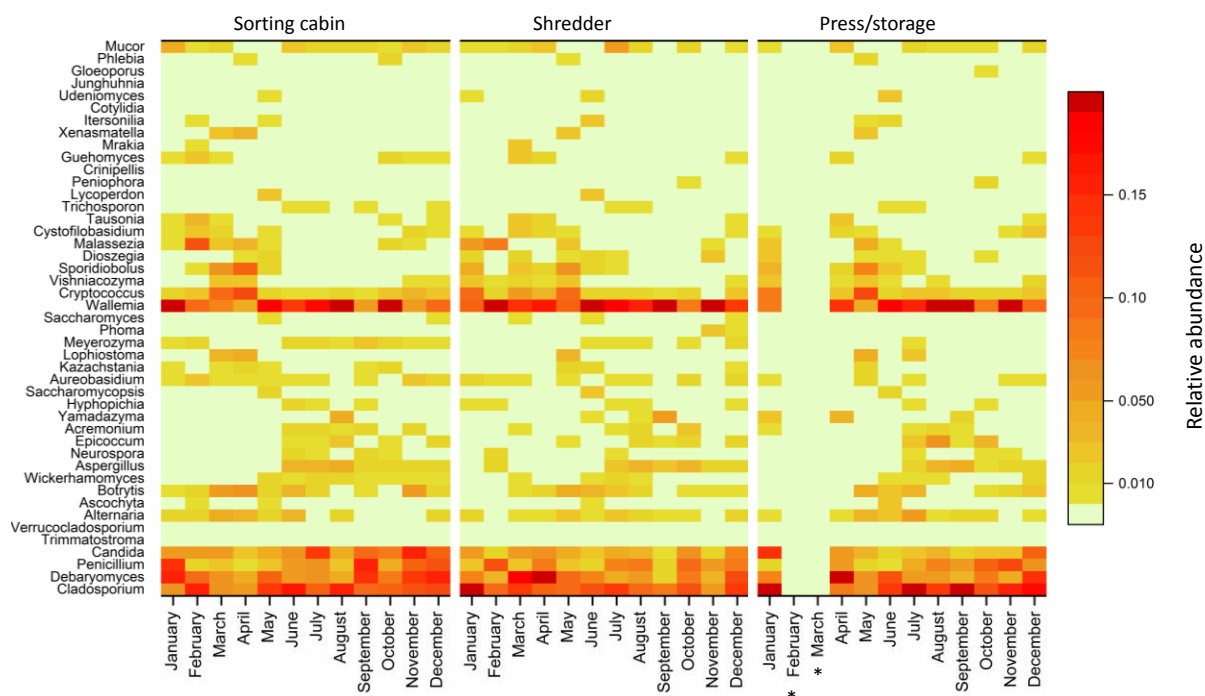


Figure S 7 Fungal biodiversity at the genus level in bioaerosols emitted: in the sorting cabin, near the shredder and near the press and the bales storage area (* no data collected for the samples).

Partie 5

Impact des paramètres
environnementaux sur la
biodiversité microbienne
émise dans un centre de tri
des déchets

Partie 5: impact des paramètres environnementaux sur la biodiversité microbienne émise dans un centre de tri des déchets

1. Résumé

L'article précédent a montré la grande variabilité de la biodiversité bactérienne et fongique des bioaérosols prélevés dans le centre de tri investigué au cours de l'année de prélèvement. L'objectif de ce chapitre est d'expliquer ces variations et d'identifier les paramètres environnementaux influant sur la composition microbienne des bioaérosols émis dans ce centre de tri des déchets.

Des prélèvements de bioaérosols ont été effectués pendant un an dans un centre de tri des déchets français. Les activités manuelles de tri étaient réparties dans deux cabines où une cinquantaine de salariés avaient pour tâche de séparer les déchets ménagers.

Les prélèvements ont été réalisés à point fixe à cinq endroits différents au cœur des activités de tri et dans un bureau non exposé aux déchets représentant la référence intérieure. Ces prélèvements ont été réalisés un jour par mois pendant un an, un jour par semaine pendant un mois précis et chaque jour pendant une semaine précise. Les bioaérosols ont été collectés sur filtres en polycarbonate placés dans une cassette fermées de 37 mm à 10 L.min⁻¹ pendant 5h. En parallèle, la température et l'humidité relative a été mesurée à chaque point de prélèvements (Labguard® 3D Mobiguard, Biomérieux, France). Les données atmosphériques (température, humidité relative et pluviométrie) du jour du prélèvement ainsi que des trois jours le précédent ont été renseignées par une sonde météorologique située à proximité (49,07°N ; 6,13°E). Le nombre de salariés et la quantité de déchets traités ont également été renseignés. Après extraction de l'ADN génomique (FastDNA®SPIN kit for soil, MP Biomedicals, USA), la région ITS2 fongique et l'ADNr 16S bactérien ont été séquencés (MiSeq, Illumina) par un prestataire extérieur (INRA Transfert, France). L'analyse bio-informatique des séquences a été exécutée sous le logiciel Mothur (Schloss and Westcott, 2009). Les différences de composition entre les bioaérosols prélevés au sein des activités et la référence intérieure ont été évaluées par le calcul du coefficient de Sorensen-Dice. Plus ce coefficient est proche de 1 et plus les deux échantillons ont une composition identique. Des tests de Mann-Whitney et Kruskal-Wallis ont également été effectués pour attester de la différence statistique des indices de biodiversité Shannon et richesse spécifique. Une analyse de données utilisant des réseaux Bayésiens a permis d'évaluer l'impact des paramètres environnementaux sur les résultats de biodiversité (BayesiaLab).

Comme décrit dans le précédent chapitre, 605 genres bactériens et 592 genres fongiques ont été détectés au cours de l'année de prélèvement. Les tests de Mann-Whitney réalisés sur les valeurs de Shannon et de richesse spécifique entre les différentes périodicités ont montré une différence significative des valeurs de l'indice de Shannon entre les échantillons prélevés chaque mois et ceux prélevés au sein d'un mois. Le calcul du coefficient de Sorensen-Dice a montré une différence significative de composition entre les points dans l'entreprise et la référence. Cette différence est

d'autant plus marquée pour la biodiversité fongique lorsque l'humidité relative au point de prélèvement est élevée. Pour la biodiversité bactérienne, cette différence est plus marquée lorsque les températures mesurées sont basses. Avec l'analyse avec le réseau Bayésien, les échantillons de bioaérosols ont été classés sur des bases statistiques en différents groupes de biodiversité similaire (20 pour les champignons et 17 pour les bactéries). Les bioaérosols fongiques ont été classés en fonction du moment de prélèvement (mois ou saison). L'impact de la nature de l'activité de tri (tri manuel, broyage, presse) sur la composition des bioaérosols n'est pas identifié. D'après ces observations, il semblerait que le moment de prélèvement affecte la composition du bioaérosol fongique prélevé en centre de tri. Néanmoins, les conditions de température et d'humidité relative ne suffisent pas à expliquer la composition fongique ($R^2 < 40\%$ après modélisation par régression multiple et du modèle linéaire général). D'autres facteurs influent sur cette biodiversité. En ce qui concerne la biodiversité bactérienne, aucun paramètre investigué n'a permis de déterminer le ou les facteurs qui ont conduit à la formation des différents groupes après l'analyse avec le réseau bayésien. L'hypothèse privilégiée est que la nature du déchet ainsi que son temps de stockage dans l'entreprise ont également un effet important mais non quantifiable sur les résultats de biodiversité bactérienne et fongique.

Cette étude a permis de quantifier la complexité de la biodiversité bactérienne au regard des différents indices d'alpha diversité (richesse spécifique et indice de Shannon). Ces variations sont d'autant plus importantes que les jours de prélèvements sont éloignés. L'analyse statistique a permis de montrer une différence de composition entre les bioaérosols émis lors des activités de tri par rapport à ceux émis dans des locaux administratifs. En revanche, il n'y a pas de différence de composition microbienne entre les différents points dans l'entreprise. Les variations de biodiversité fongique observée durant l'année de prélèvement peuvent être en partie expliquées par la saison. Il en résulte une grande complexité de la biodiversité microbienne qui n'est pas prédictible sur la base des données collectées dans cette étude et dont le résultat dépend du moment de prélèvement. Pour avoir une bonne représentativité de la biodiversité microbienne, plusieurs mesures effectuées dans des conditions climatiques différentes sont nécessaires.

2. Article 4 : Impact of environmental parameters on microbial biodiversity of bioaerosols emitted in a waste sorting plant

Jodelle Degois¹, Frederic Clerc¹, Xavier Simon¹, Cyril Bontemps², Pierre Leblond², Philippe Duquenne^{1*}

¹ Department of pollutant metrology - Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS), Vandœuvre-lès Nancy, 54500, France ; ² Université de Lorraine, Institut National de la Recherche Agronomique, Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne (DynAMic), UMR INRA 1128, Nancy, 54000, France

Article non soumis

ABSTRACT

The airborne biodiversity may be impacted by environmental parameters. The aim of the study was to assess the determinants which impact the microbial biodiversity in bioaerosols emitted in a waste sorting plant. To do this, bioaerosol samples were collected in a waste sorting plant over one year at five waste-exposed locations and an indoor reference using filtration devices. After genomic DNA extraction, the bacterial 16S rDNA and the fungal ITS2 were sequenced. A statistical analysis including alpha diversity parameters and Sorensen-Dice coefficient calculation was performed followed by an approach using a Bayesian networks. The results showed that the waste-exposed bioaerosols had a specific composition regarding to the reference regardless the seasons. A temporal variation was observed for both bacterial and fungal compositions. The fungal variations may be explained by the season whereas no studied parameters could explain the bacterial variability. The bioaerosol emitted in waste sorting plant was complex and the origin of the variation of its composition was multifactorial. To get accurate and representative biodiversity results of bioaerosols in this environment, it is recommended to multiply the samples, collected at different moment of the year.

INTRODUCTION

Waste treatment activities such as waste collection, waste sorting or waste composting are reported as a source of bioaerosols emission (Tolvanen 2001 *et al.*, 2013; Sebők *et al.*, 2015; Madsen *et al.*, 2016). Exposure to these bioaerosols can induce various health disorders and more especially respiratory adverse effects for workers (Douwes *et al.*, 2003; Lavoie *et al.*, 2006; Bellemain *et al.*; 2010). A very few published studies investigated the microbial composition of the bioaerosols. The data highlighted a real complex biodiversity with an extended number of taxa at each classification level (Lehtinen *et al.*, 2013; Viegas *et al.*, 2014; Degois *et al.*, 2017; Mbareche *et al.*, 2017). Most of the time, few bioaerosol samples were collected and regarding to the high complexity of the bioaerosols, the representativeness of the results appears uncertain. Some studies investigated the variations of the biodiversity in bioaerosols from different environments and environmental parameters such as temperature, relative humidity and more generally the season were identified as a potential determinant of the microbial biodiversity in bioaerosols from wastewater treatment

plants (Ding *et al.* 2016), swine houses (Kumari *et al.*, 2016) and outdoor air (Bowers *et al.*, 2012). The results and the parameters varied from a study to another one. Because of the high complexity of the environmental parameter impact, no extrapolation can be made from data found in a given environment to another one. Such investigations were not performed yet for the bioaerosols emitted in waste sorting plant. However, understanding the factors that may induce variation in airborne communities will improve the knowledge about the worker's exposure to microbial particles. It also could provide useful information for the establishment of further sampling strategy. Biodiversity measurement was performed in a waste sorting plant (WSP) for one year. The aim of the present study was to investigate the environmental parameters which may impact the microbial biodiversity in the bioaerosols emitted in a waste sorting plant.

MATERIALS AND METHODS

Waste sorting plant and sampling points

The waste sorting plant was located in the east of France and employed about 50 workers for the sorting activities. The plant treated non-hazardous household and industrial wastes. The household wastes (journal newspapers, papers, cardboards, food packaging...) were sorted depending on the material; the industrial wastes (furniture) were shredded and burnt to supply the hot water system in the neighboring town. The general organization of the plant and the sorting activities is given in figure 1. The household wastes were unloaded on the floor in a large waste sorting area (1) and were transported via conveyer belts to a first-sorting cabin (2) where two workers removed the big cardboards. Wastes were then conveyed to a trommel and to a second cabin dedicated to the manual removal of plastic bags. The remaining wastes were treated in a third sorting cabin (3) by several workers (about 10 depending on the shift). Finally, the sorted wastes were pressed in bales and stored in a dedicated area (5) before they were sent for recycling of materials in other plants. The industrial wastes were dropped in a different area (4); they were shredded and sent to an incinerator using a conveyor belt. Five sampling points were placed close to significant working areas inside the plant: the point 1 in the unloading area, the point 2 in the first sorting cabin, the point 3 in the third sorting cabin, the point 4 near the shredder and the point 5 near the press (figure 25). In addition, an indoor reference was sampled in a meeting room located in another part of the building.

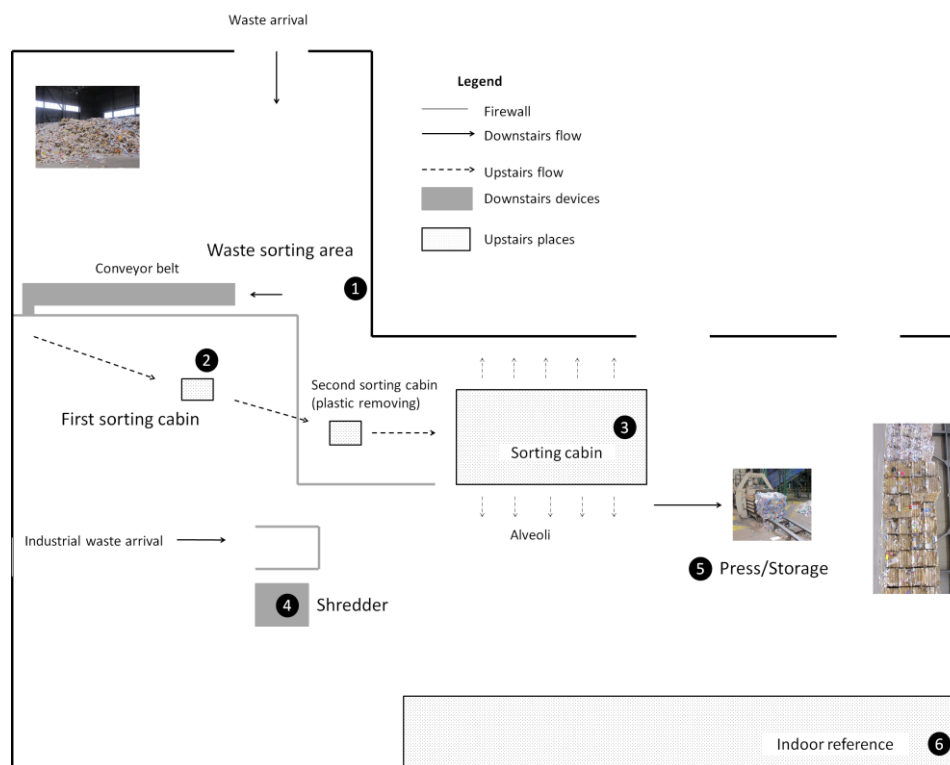


Figure 25 Schematic organization of the waste sorting plant and location of the sampling locations.

Bioaerosols sampling

The sampling campaign took place in 2016 with different time scales. For the investigations of yearly variation of microbial biodiversity, the stationary samples were collected for all the sampling points, every month and for all the 12 months in the year. Investigations of monthly variation were carried out by collecting bioaerosol samples. In addition, during June, bioaerosols were sampled one day per week for 3 consecutive weeks for all the sampling points. Weekly variation was investigated during three consecutive days in June (points 2, 3 and 4). The bioaerosol sampling was performed by air filtration through polycarbonate filter (0.8 μm pore size, Nuclepore®, France) and a backing pad (Millipore®, thick absorbent pad) placed in a 37 mm closed-faced cassettes (CFC). The CFC were connected to a constant flow rate pumps (Bravo, Tecora, France). The air flow rate was calibrated at 10 L.min⁻¹ before the beginning of the sampling and measured at the end of the sampling with a flow meter (Mass Flowmeter 4040, TSI Inc., USA). The sampling devices were placed at 1.7 m above ground level and sampling was performed for five hours. Samples were transported and stored at 4°C to the laboratory for analysis within 24 h after the end of the sampling. Temperature and relative humidity were monitored using a real-time measuring device (Labguard® 3D Mobiguard, Biomérieux, France) located near the CFC.

Filters treatment

Before analysis, the particles were eluted from the filter by addition of 5 mL of sterile solution containing Tween 80 at 0.01% inside the CFC inlet. Then, the CFC were shaken at 2000 rpm for 20 min at room temperature. The eluted particles were collected using a sterile needle. A volume of 500 μL of the subsequent solution was used for the biological molecular analysis.

DNA extraction

The DNA extraction was performed immediately after the particles elution. The genomic DNA was extracted using a commercial kit according the manufacturer's instructions (FastDNA® SPIN kit for soil kit, MP Biomedicals, Illkirch, France). Two aliquots of 50 µL per samples were stored at -20°C until analysis.

DNA sequencing and bioinformatics analysis

The preparation of DNA samples (purification and amplification) and sequencing were performed by an external provider (INRA Transfert Environnement, Narbonne, France). The bacterial 16S rDNA was amplified with the universal primers F-GTGYCAGCMGCCGCGGTA and R-CCCGYCAATTCMTTTRAGT and the fungal barcode ITS2 was amplified using the primers w404 CTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTTGTGARTCATCGAATCTTTG and w40 GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTCCGCTTATTGATATGC. The PCR mixture contained 5 µL of DNA template, 4 µL of dNTPs (25 mM), 1 µL of each primer (100 ng.µL⁻¹), and 0.5 µL of Taq polymerase in a final volume of 50 µL. The temperature for the denaturation step was 95°C for 2 min followed by an annealing step at 56°C for ITS and 65°C for 16S rDNA for 1 min and finally an elongation step at 72°C for 1 min. The DNA was sequenced using Miseq technology (Illumina, San Diego, USA). For the sequence preprocessing, the ITS2 and 16rDNA reads were trimmed and denoised. The barcodes, primers and homopolymers longer than 8 pb were removed using Mothur software (Schloss *et al.*, 2009). Chimera were detected and deleted using UNCHIME (Edgar *et al.*, 2011) executed in Mothur. To reduce the reads number, the reads with 100% of identity were clustered in unique sequence. The bacterial sequences were assigned using the "classify.seq" command in Mothur using the SILVA data base. The fungal biodiversity was assessed at the genus rank by assignation of the sequences using massBLASter algorithm in UNITE database (<https://unite.ut.ee/analysis.php>) with an E-value superior at 10⁻⁶⁰ and a homology superior at 95%.

Statistical analysis

Samples labeling

The samples were named with a specific label: a letter (B) for bacterial sample or (F) for fungal sample, a number from 1 to 12 for the month of sampling and finally a number from 1 to 6 for the sampling location in the plant (see the waste sorting plant map). This annotation was represented in the figures about the Bayesian statistics.

Parameters calculation for Alpha diversity

The specificity richness (SR) at the genus rank was calculated as the total genera number in a given sample. In addition, the Shannon index was calculated with the following formula: $H' = -\sum P_i \times \ln P_i$, where $P_i = N_i/N$ where N_i is the read number in given OTU and N is the total number of reads. The values of Shannon's index are between 0 and $\ln S$, (S =the total taxa number).

These parameters were calculated in order to evaluate the Shannon index and the SR differences between 1) samples collected during the same week and samples collected in the same month, 2) samples collected during the same month (June) and samples collected during the year of sampling, at three sampling locations: the first-sorting cabin (point 2), the sorting cabin (point 3) and the

shredder (point 4). To assess the statistical differences, the Mann-Whitney and the Kruskal-Wallis tests were performed using the Statgraphics Centurion XVI software (Statistical Graphics Corp.,USA).

Calculation of the Sorensen-Dice coefficient

For measuring the beta diversity between measurements, the Sorensen-Dice coefficient (QS) is used. QS is also named the “Whitaker species turnover” in this particular situation where only the presence/absence of genus is monitored (Tuomisto 2010). In probabilistic terms, this value is also the conditional probability for observing common genus between the measurements. The Sorensen-Dice coefficient (QS) was calculated to compare the similarity of composition between the bioaerosols emitted inside the plant and at the indoor reference. This index is based on the number of common taxa present in a first sample (X) and in a second sample (Y) divided by the total taxa number (X+Y). The more the compositions between the two samples are close each other, the more the index value is near 1 (total similarity of the composition). In the present study, the sample X corresponded to one of the sampling point in the plant and the sample Y to the indoor reference. The Sorensen-Dice index was calculated for bacterial and fungal biodiversity at the genus rank for four month: January (winter), April (spring), August (summer) and October (fall). These months were chosen because of the success of the sequencing for both the genetic targets at all the sampling points.

$$QS = \frac{2|X \cap Y|}{|X| + |Y|}$$

Correlation calculation

To establish a relation between the Sorensen-Dice coefficient with the temperature or the RH, the rho of Spearman was calculated with the Statgraphics Centurion XVI software (Statistical Graphics Corp.,USA). The calculation was performed with the rank of the values instead of the values themselves in order to get rid of the extreme values.

Bayesian networks statistics

For identifying the similarities between the measurements, a statistical technique based on Bayesian networks was used (Naïm et al 2007). The software implementing this technique is BayesiaLab (www.bayesia.com). For each measurement, the biodiversity data were summarized into the presence (value 1) or absence (value 0) of the genus. Each measurement is then a vector whose each coordinate symbolizes the presence or absence of a specific genus (Table S6). The total number of present genera per measurement measures the alpha diversity: in this case, the measurement richness is used. It is expressed as a percentage in the Bayesian network.

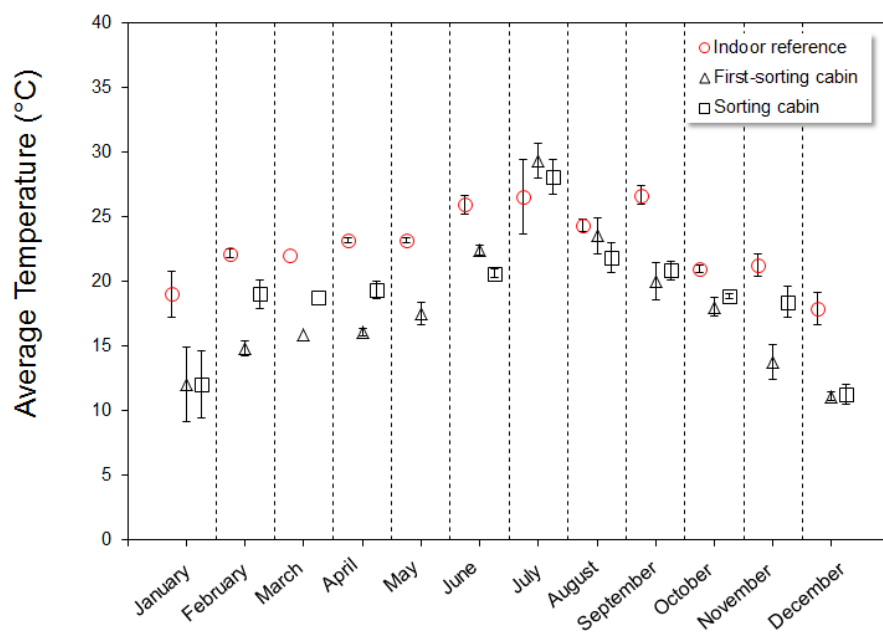
Based on these data, the principle consists in an automatic building of a network that highlights the statistical correlations between the measurements, based on the frequency of common genus in measurements. Each measurement becomes a node and whenever a statistical correlation is strong enough (p value < 0,000), then a link between the nodes is drawn (Figure S8). In a second step of the statistical analysis, a data clustering method is applied for forming groups of nodes whose similarity is strong enough. In the figure S8, the nodes with a same color belong to the same group. This analysis can be viewed through a dendrogram whose higher level materializes the best compromise between the overall number of groups formed and the average similarity inside groups.

It is expected that the standard statistical settings for forming the groups allow identify patterns of biodiversity between measurements, in particular depending on the season when the measurement was realized.

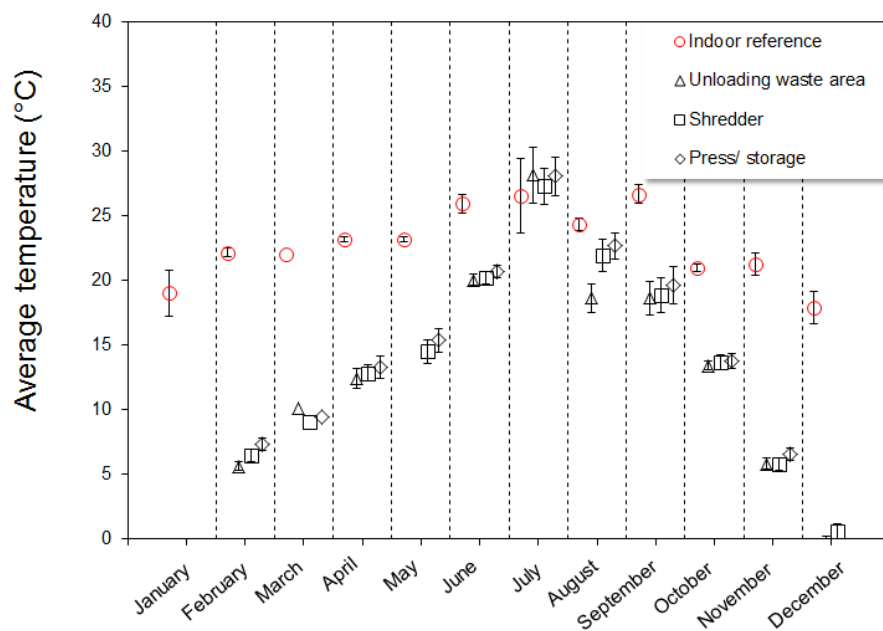
RESULTS

Environmental parameters

Temperature and relative humidity (RH) were measured in real time during the entire duration of sampling. An important variation of temperature was observed depending on the month and on the location of sampling (figures 26 a. and b.). Indeed, the temperature was maximal (about 27°C) in summer (July) and minimal in winter (January or February) with about 0°C in the hall and 12°C inside the cabins. The temperature monitored in the indoor reference was more stable than the ones measured at the occupational locations inside de WSP and was about 20°C. Inside the sorting plant and more particularly in the hall, the temperatures were significantly lower than in the indoor reference but they were similar from one sampling point to another in the hall. There were more differences between the cabins. Recorded values of RH, varied from 28% to 60%. The RH values measured in the two cabins were close to the IR value but, in the hall, the air was wetter especially in fall and in winter (figure 27 a. and b.).

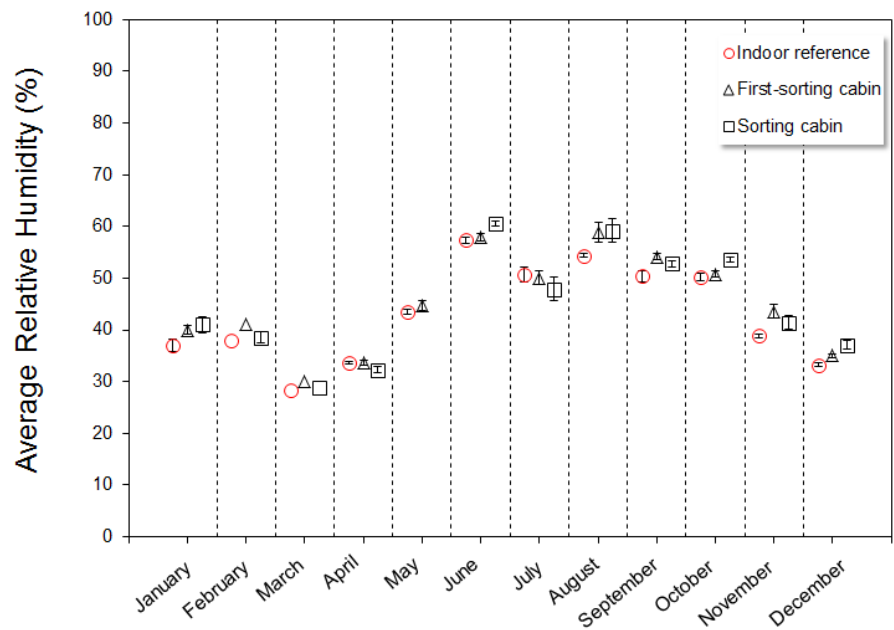


a.

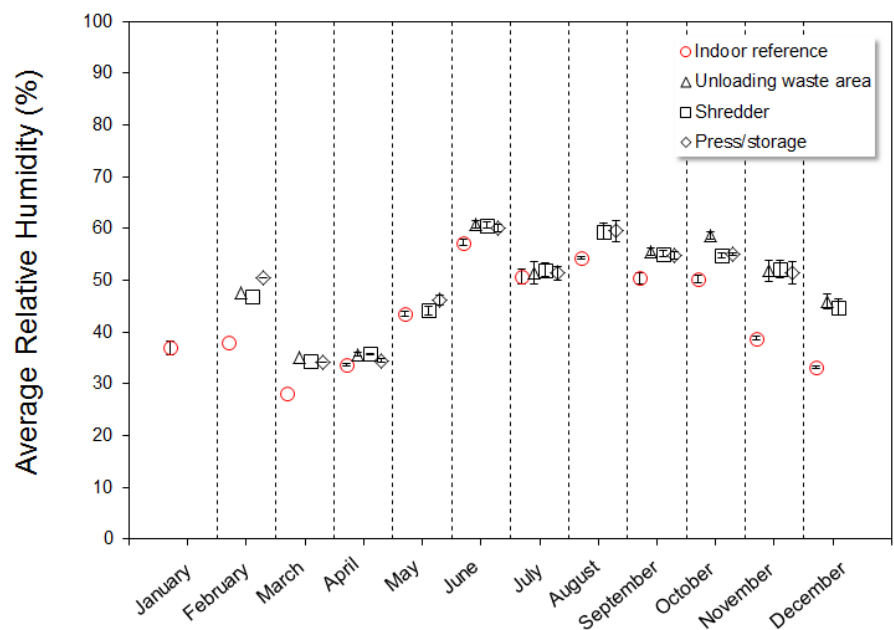


b.

Figure 26 Temperatures measured at each sampling points: a. in the cabins, b. in the hall. In each graph, the temperature measured in the indoor reference was represented.



a.



b.

Figure 27 Temperatures measured at each sampling points: a. in the cabins, b. in the hall. In each graph, the relative humidity measured in the indoor reference was represented.

Variation of alpha biodiversity parameters overtime

The comparison of the bacterial alpha biodiversity parameters was not performed for the point 3 due to the lack of sequencing data. Indeed, the bacterial DNA concentrations for the monthly variation assessment were too low to allow the sequencing.

No statistical differences were found between Shannon indexes for the week and month values for both for bacteria and fungi, whatever the sampling locations (table 7). The Shannon index was significantly different between June and the rest of the year at the sampling points 2 and 4 for bacteria and at the points 3 and 4 for fungi. The Shannon index values were higher for the bacterial biodiversity (about 4-5) than for the fungal one (from 2 to 3), indicating a more important fungal entropy. The number of microbial genera did not depend on the period of sampling whether for neither bacteria nor fungi. Indeed the number of bacterial genera varied from 128 (January) to 312 (March) in the first-sorting cabin and from 48 (May) to 323 (August) near the shredder. The same results were observed for fungal biodiversity with a variation ranging from 55 (January) to 251 (July) and from 38 (November) to 222 (July) in the first-sorting cabin, from 49 (February) to 158 (July) and near the shredder respectively.

Table 7 Statistical differences between alpha biodiversity index (Mann-Withney test)

		Point 2	Point 3	Point 4
Bacteria				
Shannon	Month vs week	0.82	-	0.83
	June vs year	0.0065*	-	0.044*
Specific richness	Month vs week	0.84	-	0.268
	June vs year	0.64	-	0.50
Fungi				
Shannon	Month vs week	0.82	0.51	0.27
	June vs year	0.11	0.0044*	0.0081*
Specific richness	Month vs week	0.26	1.0	0.51
	June vs year	0.67	0.45	0.85

*significant difference ($p < 0.05$)

Point 2: first-sorting cabin

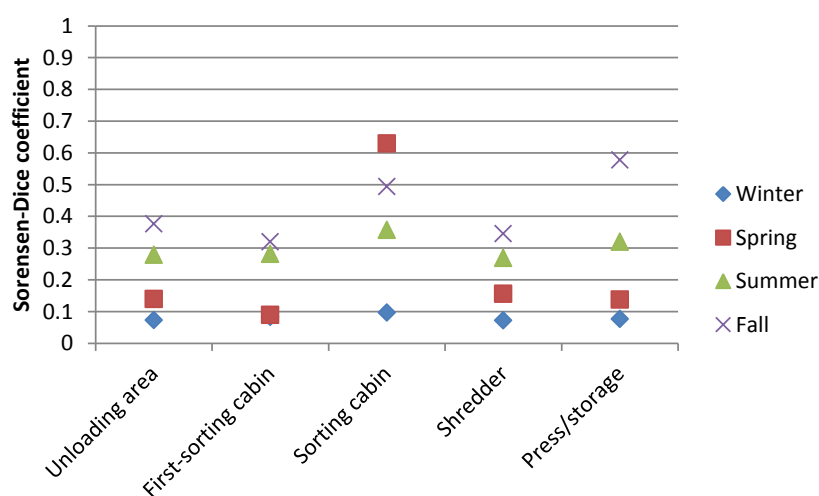
Point 3: sorting cabin

Point 4: shredder

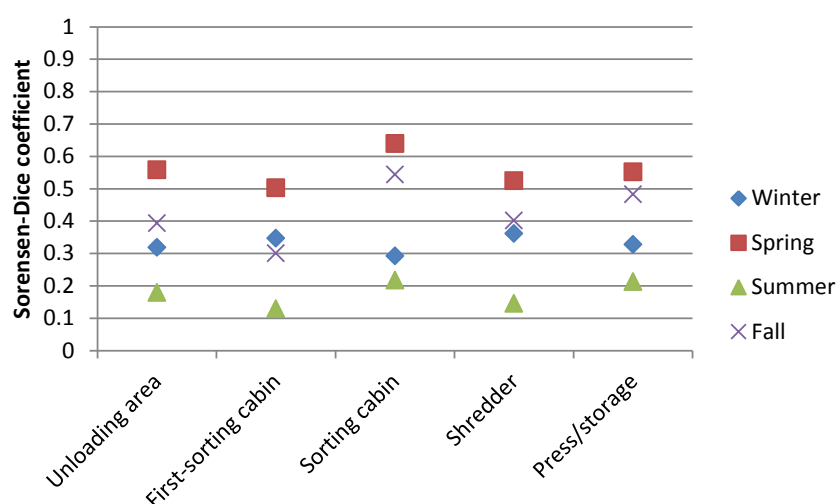
Biodiversity in the plant vs in the indoor reference

The similarity of microbial composition between the IR and the sampling points inside the waste sorting plant (WSP) was assessed by calculating the Sorensen-Dice coefficient. A coefficient near 1 meant that the two samples had a similar composition. For bacterial composition, this coefficient varied from 0.07 in winter to 0.6 in spring in the sorting cabin (figure 28.a). Except for 2 values, the coefficient was inferior to 0.5. It was lower in winter and in spring (except for the sorting cabin) and was higher in fall and summer. The bacterial composition was more similar in the occupational areas and in the IR in fall-summer than in winter-spring. The same calculation was done for fungal biodiversity (figure 28.b). The values varied from 0.12 to 0.64. The Sorensen-Dice was minimal (about 0.15) in summer and maximal in spring with values superior to 0.5. The fungal composition in bioaerosol samples collected at the IR and at the sampling points in WSP showed similarities in spring and in fall. For bacterial biodiversity, a positive correlation was observed between the Sorensen-Dice

coefficient values and temperature values ($p=0.51$, $n=20$, $r^2=0.04$). The more the temperature increased, the more the bacterial bioaerosols had a similar composition with the indoor reference. The fungal biodiversity was negatively correlated with RH ($p=-0.67$, $n=20$, $r^2=0.01$), the more the RH increased, the more the fungal bioaerosols had a different composition as compared to the indoor reference. The Kruskal-Wallis test was calculated comparing the Shannon index among the several sampling points. For bacterial biodiversity, significant differences ($p=0.003$) among the Shannon index values calculated from the six sampling locations. The notched boxplot showed a significant difference between the waste-exposed points and the indoor reference (Figure S9.a). This test was also done for the fungal biodiversity with the similar tendencies than those observed for bacterial biodiversity ($p=0.039$) but the notched boxplot didn't show any differences between the sampling areas (Figure S9.b).



a.

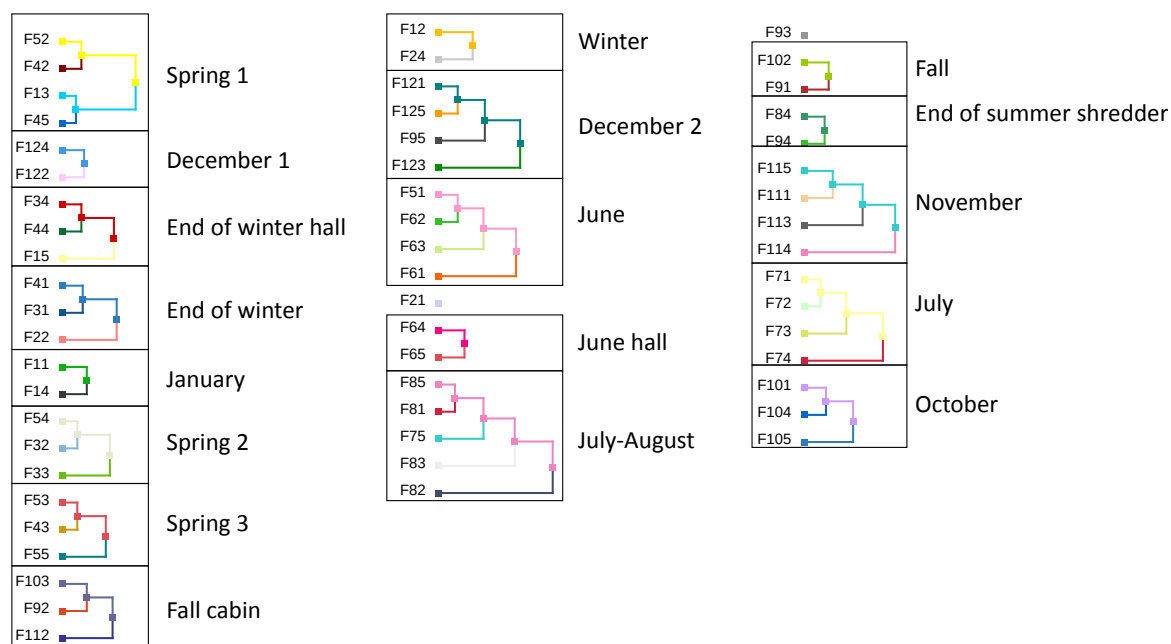


b.

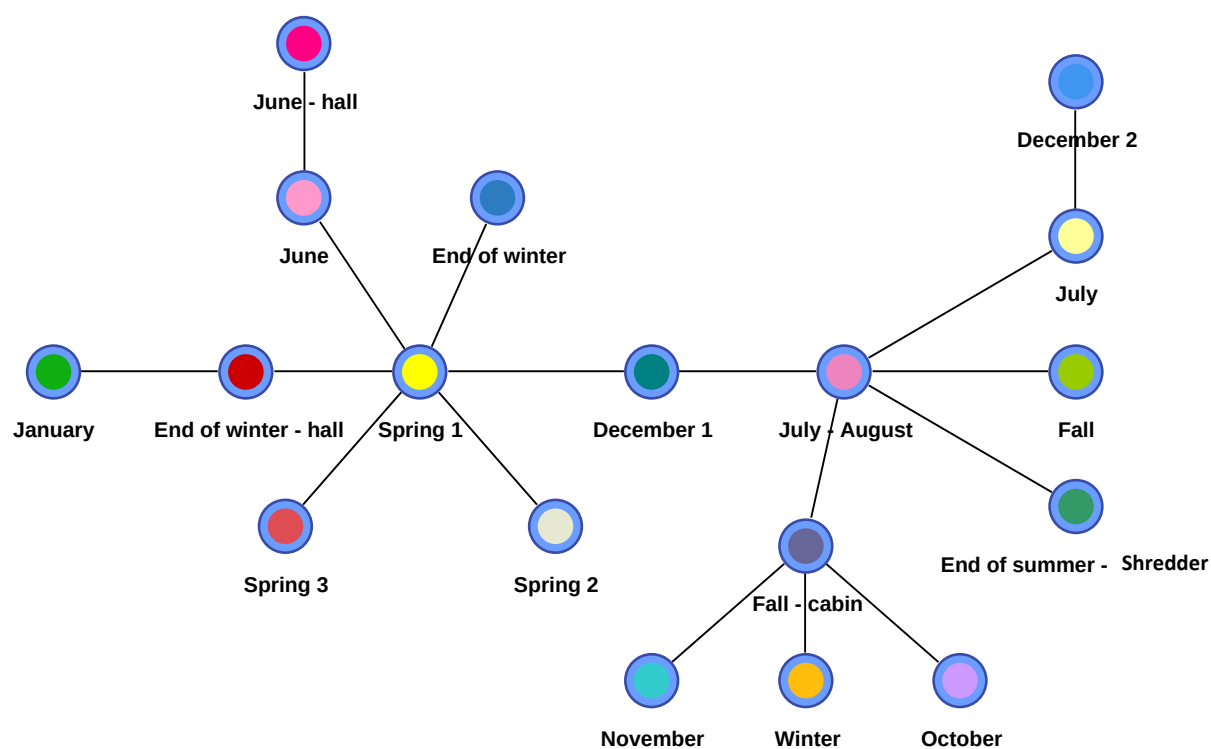
Figure 28 Sorensen-Dice coefficient for a. bacterial and b. fungal biodiversity. This coefficient represents a distance of community composition between a sampling point and the indoor reference. More the coefficient is high and more the two samples had a similar composition.

Results from Bayesian networks statistics

The Bayesian networks were used to regroup the bioaerosol samples according to the similarities in their microbial composition at the genus level. After a first clustering, several clusters which statistical similar composition were found: 20 for fungal biodiversity and 17 for bacterial biodiversity (figure 29.a and S10). The sample number in a cluster varied from two to five. Two samples had a specific composition and constituted a cluster by their own. These samples were not considered in the cluster analysis. After the clustering, the composition of each cluster was analyzed to determine the common parameters between the samples constituting this cluster. These parameters included the day or location of sampling, the intensity of activity (amount of wastes), the number of workers, the climatic conditions measured at each sampling points, the atmospheric conditions during and three days before the collection. The clusters were then named by the identified parameters. This was done for the bacterial diversity (figure S10) and for the fungal biodiversity (figure 29.a). For fungi, 18 factors were linked to a parameter most of time related to the day of sampling. After the first clustering, a second Bayesian analysis was performed to establish relationships between the renamed clusters (figure 29.b). The “spring” cluster is connected with clusters winter, June and other spring-related clusters.... The 8 clusters represent a total of 24 samples. The cluster “July August” is connected with clusters fall, summer and winter. It contains 9 clusters represent a total of 27 samples. The cluster “December 1” links these two groups, and it is composed by four bioaerosol samples. This analysis shows that the composition of microbial aerosols is related with the seasons of the year. For bacteria, no relation with identified parameters was found to link the samples. In a same group, they were bioaerosols sampled at different locations and at different time (figure S10).



a.



b.

Figure 29 Bayesian network analysis for the fungal samples. a. The fungal samples were clustering depending on their commun genera into nodes, the letter F reports to fungal sample, the first number to the month and the last number to the sampling location b. the several nodes were clustering depending their similarity of fungal composition.

DISCUSSION

Time variations of alpha biodiversity

A great variation of the specific richness was observed over the year at the genus level but also at the family level (data not shown) for both the bacterial and fungal communities. These variations were observed between the several sampling points but also for the different time scale of sampling. No logical distribution of the specific richness values was found all along the study, the minimal and the maximal index values were obtained for different dates and seasons depending on the sampling points. As a consequence, RS was not a good indicator for the description of bacterial and fungal biodiversity during sorting tasks due to its wide variation. The Shannon index also varied but in a wider range, between the different months of sampling than between the different samplings made during the same month but not for all the points. When a difference was observed, the mean and median values of the Shannon index were higher for a large time scale.

Sorting activities compared with indoor reference

The Sorensen-Dice coefficient is a good index to evaluate a distance of composition between two samples. In the present study, a significant difference (index value < 0.5) was found between the sorting activities and the indoor reference for all the studied seasons. This result suggested that the workers handling wastes were exposed to a specific bioaerosol as compared to the administrative staff. For airborne bacterial communities, the difference in biodiversity between waste-exposed sampling points and the indoor reference was higher in winter and in spring which corresponded to the cold seasons and when the highest differences in temperature between the two sampling locations were observed. The climatic conditions were apparently less favorable to bacterial growth in the plant. Despite the low temperatures measured, the specific richness was higher at waste-exposed locations than in indoor reference. It suggested that the waste may contribute significantly to bacterial biodiversity. For fungal communities, the difference of composition between waste-exposed sampling points and the reference was less significant with higher difference observed when the temperatures were extreme (in winter and in summer). The indoor reference was heated during the winter and cooled during the summer by an air conditioning system (air drying). Moreover, the air in the administrative building was renewed by outdoor air that surrounded the waste treatment building. As a consequence, a pollution of the indoor air by the outdoor air may have occurred. Such a phenomenon has already been described (Adams *et al.*, 2013) and could explain the similarities in fungal biodiversity between the two locations in winter and in summer.

In the present study, no differences in microbial biodiversity were observed between the sampling points inside the waste treatment buildings, neither by Bayesian network analysis nor by Shannon index analysis. This could be explained by the temperatures and the relative humidity which were similar among sampling points especially in the hall (sampling points 1, 4 and 5). The difference was more pronounced between the two sorting cabins. The wastes were the main emission source of bioaerosols and were the same at every sampling point, excepted for the sampling point number 4. The only changing parameter regarding to the waste was the duration of storage at each point (several days, weeks or month at the locations 1 and 5; some minutes at the locations 2 and 3). What's more, the workers opened the two doors located at each side of the box in order to decrease

the temperature in the first-sorting cabin during hot season. However, the first-sorting cabin was located in front of the shredder which produced large amounts of airborne dust (speck of dust visible to the eye) and which may contaminate the air of the first-sorting cabin. All these observations could explain the similarities of microbial composition detected between the waste-exposed locations.

Seasonal variations of biodiversity

The Bayesian network approach allowed a clustering of the fungal bioaerosol samples depending on their similarity of composition. The results showed a gathering according to the month or the season of sampling (consecutive months) regardless the locations of the waste-exposed samples. The period of sampling did not explain the gathering of the airborne bacterial samples. No other parameters (number of worker, sampling locations, amount of wastes) allowed explaining how samples were clustered by the Bayesian network analysis for both bacterial and fungal communities. Seasonal variations in concentrations of airborne microorganisms were investigated in studies carried out in outdoor air from different countries (Bowers *et al.*, 2012; Bezerra *et al.*, 2014; Crandall and Gilbert 2017) and in indoor air (Chao *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2010; Frankel *et al.*, 2012). The seasonal variations were also investigated in occupational environment such as wastewater treatment plant (Tolvanen 2001; Oppliger *et al.* 2005; Ding *et al.*, 2016), swine confinement buildings (Nehme *et al.*, 2008), composting plants (Fracchia *et al.*, 2006), biowaste collection (Nielsen *et al.*, 2000). The corresponding studies reported contrasting results regarding the effect of season on concentrations of airborne microorganisms.

Several studies found a seasonal variability of microbial biodiversity in bioaerosols but the impact of the season on microbial communities depended on the study and the investigated place. In outdoor air, the fungal species richness varied depending on the season with an higher Ascomycota diversity in spring and higher diversity of Basidiomycota in fall (Fröhlich-Nowoisky *et al.*, 2009). The bacterial community assessed in USA was significantly distinct in summer than in other seasons (Bowers *et al.*, 2012). At occupational settings, an important variation of airborne fungal biodiversity was observed in swine houses with a higher fungal diversity (and abundance) found in winter and a more heterogeneous β diversity during the summer (Kumari *et al.*, 2016). In wastewater treatment station, more bacterial species were observed in June as compared to September January with only Firmicutes in January and September and Firmicutes and Proteobacteria in June (Ding *et al.*, 2016). In swine confinement buildings, the bacterial biodiversity assessed by DDGE did not varied across seasons (Nehme *et al.*, 2008). No general tendency was observed regarding to the published data and the impact of environmental parameters is difficult to predict (Liao and Luo 2005). To our knowledge, the impact of environmental parameters on airborne biodiversity was not assessed in waste sorting plant and no published data can be compared to our results.

Other determinant of biodiversity in bioaerosols

Temperature and relative humidity of the air may partly explain our results as these parameters were shown to greatly influence microbial growth (Brown and Mohr 2016) as well as the aerosolization of fungal spores from contaminated matters (Madsen 2012). In the present study, the conditions of sampling were very different across the year. However, for a given sampling day, the climatic conditions were different between the hall (sampling points 1, 4 and 5) and the two cabins (points 2 and 3) and gathered in the same cluster. Thus, temperature and relative humidity were not

the only parameters impacting the airborne fungal biodiversity in the WSP. This hypothesis was confirmed by an extended statistical analysis performed on the Shannon index values combining multilinear regression analysis and general linear models. This analysis considered the temperature and the relative humidity at the sampling point but also the temperature, the relative humidity and the rainfall during the day of the sampling and three days before. The best model calculated took into account all the previous parameters and could explain only 40% of the Shannon index values (data not shown).

The impact of the environment on microbial biodiversity in bioaerosols is multifactorial and complex and combining not only the climatic conditions but also others parameters such as the amount and nature of waste or other pollutants sources. This corroborates that microbial biodiversity and more globally bioaerosol composition would be multifactorial and difficult to characterize. So far, other parameters can also impact the microbial concentrations such as human activity (Maron *et al.*, 2006), particles size and density of urban area (Fang *et al.*, 2007), air pollution (Gao *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2016), CO₂ concentrations (Chao *et al.*, 2002), operations of a process (Tolvanen 2001), indoor air pollutants (Wang *et al.*, 2010), the site investigated (Fracchia *et al.*, 2006) or physical, environmental and ecological interactions (Emerson *et al.*, 2016).

We were not able to collect information about the composition of waste and and their duration of storage time due to the organization of the plant. Indeed, waste could be stored for several months on the site before being sorted. Wastes were the main matrix for microorganism colonization and the type of waste and more particularly the content of the food packaging may have an impact on the bacterial growth. The age of the stored waste was shown to have an impact on both airborne bacteria and fungi exposure levels (Schlosser *et al.*, 2015; Gladding and Gwyther 2017).

Consequence of findings on sampling strategy

Evaluating the impact of environmental parameters on airborne biodiversity in workplaces is not easy especially because of the number of unknown or uncontrolled parameters. A pilot study would allow an accurate way to control all the potential parameters (in particular the nature of wastes) impacting the biodiversity and to assess how these parameters modify the composition of the airborne microorganisms. Even if such studies describe more simple conditions as compared to the occupational environment, they would contribute to a more accurate understanding of such a complex phenomenon.

The present study showed that the waste workers were exposed to a specific bioaerosol as compared to the indoor reference regardless the seasons and the Bayesian network approach highlighted that fungal samples were clustered on period of sampling. This encourages the collection of several bioaerosol samples over the year to get a representative overview of the actual biodiversity in bioaerosols from occupational environments. Furthermore, the statistical analysis also revealed similar microbial composition in bioaerosol from the waste-exposed areas. This suggests that decreasing the number of sampling points in the WSP would be an other way of simplification of the sampling strategy.

CONCLUSION

The study revealed the variation of microbial biodiversity in bioaerosols from a waste sorting plant across seasons and space. Indeed, the results showed that workers in the waste sorting plant were exposed to bacterial and fungal communities that appeared specific to sorting activities.

Furthermore, the biodiversity in term of specific richness and repartition of microbial genera (Shannon index) varied across the year. The variation of the fungal community can be partly explained by the season or at least the sampling time. The bacterial biodiversity was impacted by unidentified environmental parameters. The data provide the first recorded statistical approach of the variations of airborne biodiversity in WSP. These results suggest that microbial biodiversity in bioaerosols is probably multifactorial and complex, involving numerous parameters that were not all monitored in our study. Additional studies carried on more controlled conditions are needed to further investigate the impact of these parameters on microbial biodiversity. The study also provides evidence for the design of sampling strategies for an accurate assessment of biodiversity in bioaerosols from occupational environments.

REFERENCE

- Adams, R. I., Miletto, M., Taylor, J. W., Bruns, T. D. (2013). Dispersal in microbes: fungi in indoor air are dominated by outdoor air and show dispersal limitation at short distances. *The ISME Journal* 7: 1262-1273.
- Bezerra, G. F. d. B., Gomes, S. M., da Silva, M. A. C. N., dos Santos, R. M., Filho, W. E. M., Viana, G. M. d. C., Nascimento, M. d. D. S. B. (2014). Diversity and dynamics of airborne fungi in Sao Luis, State of Maranhao, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical* 47: 69-73.
- Bowers, R. M., McCubbin, I. B., Hallar, A. G., Fierer, N. (2012). Seasonal variability in airborne bacterial communities at a high-elevation site. *Atmospheric Environment* 50:41-49.
- Brown, G. S., Mohr, A. J. (2016). Fate and transport of microorganism in air. *Manual of environmental microbiology*, fourth edition. Yates, M. V., Nakatsu, C. H., Miller, R. V., Pillai, S. D. Washington DC, ASM press.
- Chao, H. J., Schwartz, J., Milton, D. K., Burge, H. A. (2002). Populations and determinants of airborne fungi in large office buildings. *Environmental Health Perspectives* 110: 777-782.
- Crandall, S. G. and Gilbert, G. S. (2017). Meteorological factors associated with abundance of airborne fungal spores over natural vegetation. *Atmospheric Environment* 162: 87-99.
- Degois, J., Clerc, F., Simon, X., Bontemps, C., Leblond, P., Duquenne, P. (2017). First metagenomic survey of the microbial diversity in bioaerosols emitted in waste sorting plants. *Annals of Work Exposures and Health* 61:1076-1086.
- Ding, W., Li, L., Han, Y., Liu, J., Liu, J. (2016). Site-related and seasonal variation of bioaerosol emission in an indoor wastewater treatment station: level, characteristics of particle size, and microbial structure. *Aerobiologia* 32: 211-224.
- Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D. (2003). Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Annals of Occupational Hygiene* 47: 187-200.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194-2200.
- Emerson, J. B., Keady, P. B., Clements, N., Morgan, E. E., Awerbuch, J., Miller, S. L., Fierer, N. (2016). High temporal variability in airborne bacterial diversity and abundance inside single-family residences. *Indoor air* 27: 576-586.
- Fang, Z., Ouyang, Z., Zheng, H., Wang, X., Hu, L. (2007). Culturable airborne bacteria in outdoor environments in Beijing, China. *Microbial Ecology* 54: 487-496.
- Fracchia, L., Pietronave, S., Rinaldi, M., Martinotti, M. G. (2006). The assessment of airborne bacterial contamination in three composting plants revealed site-related biological hazard and seasonal variations. *Journal of Applied Microbiology* 100: 973-984.
- Frankel, M., Bekö, G., Timm, M., Gustavsen, S., Hansen, E. W., Madsen, A. M. (2012). "Seasonal variations of indoor microbial exposures and their relation to temperature, relative humidity, and air exchange rate." *Applied and Environmental Microbiology* 78: 8289-8297.
- Fröhlich-Nowoisky, J., Pickersgill, D. A., Després, V. R., Pöschl, U. (2009). High diversity of fungi in air particulate matter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 12814-12819.
- Gao, M., Jia, R., Qiu, T., Han, M., Song, Y., Wang, X. (2015). Seasonal size distribution of airborne culturable bacteria and fungi and preliminary estimation of their deposition in human lungs during non-haze and haze days. *Atmospheric Environment* 118: 203-210.
- Gao, M., Yan, X., Qiu, T., Han, M., Wang, X. (2016). Variation of correlations between factors and culturable airborne bacteria and fungi. *Atmospheric Environment* 128: 10-19.

- Gladding, T. L. and Gwyther, C. L. (2017). A study of the potential release of bioaerosols from containers as a result of reduced frequency residual waste collections. *Science of The Total Environment* 576: 481-489.
- Kumari, P., Woo, C., Yamamoto, N., Choi, H. L. (2016). Variations in abundance, diversity and community composition of airborne fungi in swine houses across seasons. *Scientific Reports* 6: 37929.
- Lavoie, J., Dunkerley, C. J., Kosatsky, T., Dufresne, A. (2006). Exposure to aerosolized bacteria and fungi among collectors of commercial mixed residential, recyclable and compostable waste. *Science of The Total Environment* 370: 23-28.
- Lehtinen, J., Tolvanen, O., Nivukoski, U., Veijanen, A., Hänninen, K. (2013). Occupational hygiene in terms of volatile organic compounds (VOCs) and bioaerosols at two solid waste management plants in Finland. *Waste Management* 33: 964-973.
- Liao, C. M. and Luo, W. C. (2005). Use of temporal/seasonal- and size-dependent bioaerosol data to characterize the contribution of outdoor fungi to residential exposures. *Science of The Total Environment* 347: 78-97.
- Madsen, A. M. (2012). Effects of airflow and changing humidity on the aerosolization of respirable fungal fragments and conidia of *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 3999-4007.
- Madsen, A. M., Alwan, T., Ørberg, A., Uhrbrand, K., Jørgensen, M. B. (2016). Waste workers' exposure to airborne fungal and bacterial species in the truck cab and during waste collection. *Annals of Occupational Hygiene* 60:651-668.
- Maron, P. A., Mougél, C., Lejon, D. P. H., Carvalho, E., Bizet, K., Marck, G., Cubito, N., Lemanceau, P., Ranjard, L. (2006). Temporal variability of airborne bacterial community structure in an urban area. *Atmospheric Environment* 40: 8074-8080.
- Mbareche, H., M. Veillette, L. Bonifait, M.-E. Dubuis, Y. Benard, G. Marchand, G. J. Bilodeau and C. Duchaine (2017). "A next generation sequencing approach with a suitable bioinformatics workflow to study fungal diversity in bioaerosols released from two different types of composting plants." *Science of The Total Environment* 601: 1306-1314.
- Naïm, P., Wuillemin, P. H., Leray, P., Pourret, O., Becker, A. (2007) *Les réseaux bayésiens*. Eyrolles, Paris
- Nehme, B., Létourneau, V., Forster, R. J., Veillette, M., 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: 665-675.
- Nielsen, B. H., Nielsen, E. M., Breum, N. O. (2000). Seasonal variation in bioaerosol exposure during biowaste collection and measurements of leaked percolate. *Waste Management and Research* 18: 64-72.
- Oppliger, A., Hilfiker, S., Vu Duc, T. (2005). Influence of seasons and sampling strategy on assessment of bioaerosols in sewage treatment plants in Switzerland. *The Annals of Occupational Hygiene* 49: 393-400.
- Park, D., Ryu, S., Kim, S., Byun, H., Yoon, C., Lee, K. (2013). Airborne bacteria and fungi associated with waste-handling work. *International Journal of Occupational and Environmental Health* 19: 311-318.
- Ravva, S. V., Hernlem, B. J., Sarreal, C. Z., Mandrell, R. E. (2012). Bacterial communities in urban aerosols collected with wetted-wall cyclonic samplers and seasonal fluctuations of live and culturable airborne bacteria. *Journal of Environmental Monitoring* 14: 473-481.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M. *et al* (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7537-7541.
- Schlosser, O., Déportes, I. Z., Facon, B., Fromont, E. (2015). Extension of the sorting instructions for household plastic packaging and changes in exposure to bioaerosols at materials recovery facilities. *Waste Management* 46:47-55.
- Sebők, F., Dobolyi, C., Bobvos, J., Szoboszlai, S., Kriszt, B., Magyar, D. (2015). Thermophilic fungi in air samples in surroundings of compost piles of municipal, agricultural and horticultural origin. *Aerobiologia* 32: 255-263.
- Tolvanen, O. K. (2001). Airborne bio-aerosols and noise in a dry waste treatment plant in Pietarsaari, Finland. *Waste Management & Research* 19: 108-114.
- Tuomisto, H. (2010) A diversity of beta diversities: straightening up a concept gone awry. Part 1. Defining beta diversity as a function of alpha and gamma diversity. *Ecography* 33: 2-22.
- Viegas, C., Gomes, A. Q., Abegão, J., Sabino, R., Graça, T., Viegas, S. (2014). Assessment of fungal contamination in waste sorting and incineration—case study in Portugal. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 77: 57-68.
- Wang, Y. F., Wang, C. H., Hsu, K. L. (2010). Size and seasonal distributions of airborne bioaerosols in commuting trains. *Atmospheric Environment* 44: 4331-4338.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Table S 6 Representation of data used.

Genus	Measurement 1	Measurement 2	...	Measurement n
Staphylococcus	1	0		1
Leuconostoc	0	0		1
Aerococcus	0	1		0
Prevotella	1	1		0
...				
Mesoplasma	0	1		0
richness	$r_1 \%$	$r_2 \%$		$r_n \%$

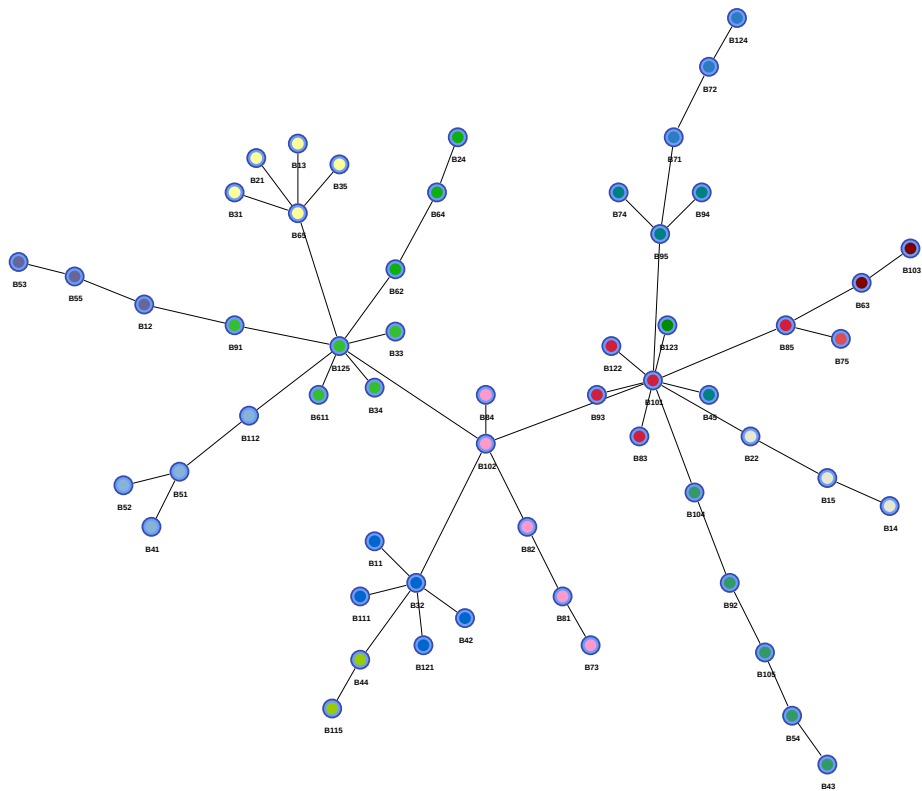
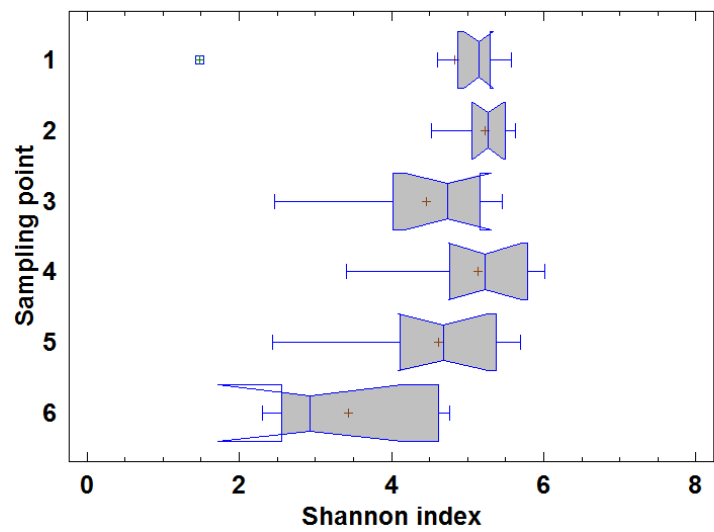
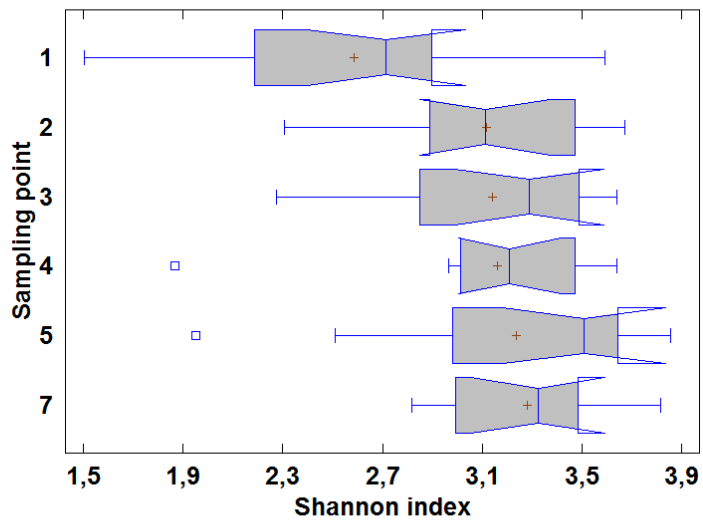


Figure S 8 Example of a Bayesian network whose nodes represent the measurements and those links represent the statistical correlations between nodes.



a.



b.

Figure S 9 Notched boxplot representing the dispersion of a. the bacterial Shannon index, b. the fungal Shannon index over the year.

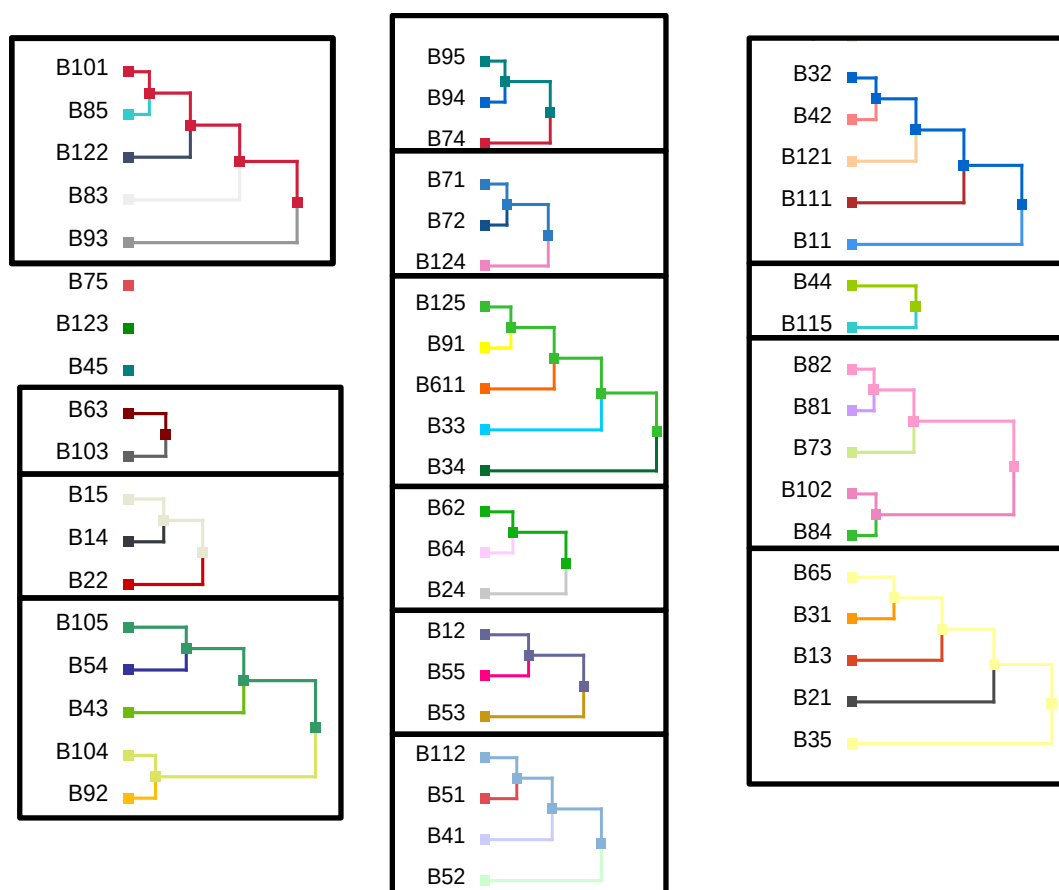


Figure S 10 Bayesian network analysis for the bacterial samples.

Conclusions et Perspectives

Conclusions et perspectives

Les bioaérosols, notamment les bactéries et moisissures aérosolisées, peuvent avoir un impact sur la santé des travailleurs qui y sont exposés. Il existe peu de méthodes standardisées pour la caractérisation des bioaérosols émis en situation professionnelle. De plus, la relation dose/réponse n'est pas établie à ce jour et les mécanismes d'actions des agents biologiques aérosolisés ne sont pas bien déterminés. Les études de mesure des bioaérosols professionnels concernent surtout l'évaluation des concentrations (bactériennes, fongiques, endotoxines, (1,3)- β -D-glucanes) et la composition de ces bioaérosols est très peu renseignée. Les techniques culture-dépendantes sont les plus utilisées pour caractériser la biodiversité et bien qu'elles fournissent des données exploitables, leurs limites sont bien connues. Les connaissances relatives à la composition des bioaérosols émis en milieu professionnel sont donc parcellaires.

La métagénomique s'est démocratisée ces dernières années notamment grâce au séquençage à haut débit. Cette approche permet de s'affranchir de la culture et de ses limites en abordant la diversité au niveau de l'ADN extractible d'un environnement donné.

La première partie du travail a été consacrée à une étude de faisabilité du processus global de mesure de l'analyse de la biodiversité microbienne dans les bioaérosols professionnels (du dispositif de prélèvement à l'extraction d'ADN). Le processus analytique a été ensuite caractérisé pour déterminer les avantages et les limites de ce protocole. Une fois défini, ce processus a été déployé dans un centre de tri des déchets ménagers pour une campagne de prélèvement d'une durée d'un an. Ce secteur a été choisi en raison de sa constante expansion et du fait que les données de biodiversité y sont lacunaires.

Les travaux de la thèse ont permis de définir une méthode pour la mesure de la biodiversité dans les bioaérosols. Cette méthode comprend le prélèvement des bioaérosols, le prétraitement des échantillons avec notamment l'extraction de l'ADN microbien, le séquençage et l'analyse bio-informatique des séquences. Le séquençage a été confié à un prestataire. Les premiers travaux ont été consacrés à l'étude de la faisabilité de la méthode et ont permis la caractérisation d'échantillons de bioaérosols prélevés dans un premier centre de tri des déchets ménagers. Le travail a permis d'analyser les séquences issues de ces échantillons, de produire les premières données de biodiversité par séquençage à haut débit dans l'environnement investigué. Le processus de mesure a permis de collecter suffisamment d'ADN (principale limite de la technique d'analyse) pour permettre la faisabilité de la méthode envisagée sur les échantillons de bioaérosols. A notre connaissance, les résultats obtenus lors de cette première campagne constituent les premières données de biodiversité microbienne dans les bioaérosols émis en centre de tri des déchets obtenues par séquençage à haut débit. Le phylum des Firmicutes est apparu comme prédominant dans la cabine de tri manuel suivi des Proteobacteria. Les taxons majoritaires détectés lors de cette campagne étaient *Enterobacteriaceae* non classifiés, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas* et *Lactobacillus*. La biodiversité eucaryote a montré une dominance des champignons avec une proportion importante des genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* et *Wallemia*.

La génération de bioaérosols fongiques complexes en laboratoire a permis d'évaluer l'impact du choix des outils analytiques sur les résultats de biodiversité fongique. La comparaison d'efficacité d'extraction entre deux kits commerciaux, très utilisés dans la littérature et dans les projets du laboratoire, a mis en évidence l'importance de l'étape d'extraction d'ADN pour les analyses de biologie moléculaire. En effet, le kit PowerSoil® DNA isolation kit de MO Bio n'a pas eu une efficacité suffisante pour permettre le séquençage des échantillons. C'est donc le kit FastDNA® SPIN kit for soil (MPBiomedicals) qui a été retenu pour tous les essais ultérieurs. La culture et le séquençage à haut débit sont apparus comme des techniques fournissant des résultats complémentaires en raison de leurs sources de biais différentes : limite de cultivabilité pour la culture ; biais lors de l'extraction d'ADN et de l'assignement des séquences pour les NGS. En ce qui concerne les NGS, la région ITS2 apparaît plus adaptée à l'étude de la biodiversité fongique que l'ADNr 18S. La méthode d'assignation des séquences constitue également une étape clé de l'analyse. Si la méthode Wang est adaptée à l'assignation des séquences ADNr 16S, elle ne l'est pas pour les séquences fongiques ITS2. L'algorithme BLAST a donné des résultats plus conformes à ceux attendus. Les résultats de biodiversité fongique dépendent de la méthode utilisée pour la caractériser. Cette partie du travail a démontré la nécessité de standardiser la méthode de mesure pour les essais de comparaison. Il a également permis de définir les outils méthodologiques nécessaires à l'étude de la biodiversité fongique des bioaérosols de terrain.

La campagne de prélèvement effectuée sur toute une année dans un deuxième centre de tri a permis de collecter un grand nombre de données relatives à la biodiversité bactérienne et fongique à six points de prélèvement, mais également aux conditions de température et d'humidité relative et des données de production dans l'entreprise. Les résultats ont mis en évidence la grande complexité de la biodiversité présente dans ces bioaérosols ainsi que les variations importantes de cette composition en terme de richesse spécifique mais également en terme d'abondance des taxons qu'ils soient majoritaires ou non. En effet, environ 600 genres bactériens et fongiques ont été détectés au cours de cette année de prélèvement. Comme dans la première campagne, les phyla Firmicutes et Proteobacteria étaient les plus présents. En dépit des variations importantes, certains genres ont été détectés toute l'année en proportions significatives parmi eux : les genres bactériens *Staphylococcus*, *Prevotella*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, et les genres fongiques *Wallemia*, *Cladosporium*, *Debaryomyces*, *Penicillium* ou encore *Candida*. L'analyse statistique a permis de démontrer la différence de composition microbienne entre les points de prélèvements situés dans l'entreprise par rapport à des références non contaminées par les déchets (intérieure ou extérieure) et ce pour les deux centres de tri investigués. Les opérateurs de tri sont donc exposés à une communauté spécifique comparés au personnel administratif. Ces différences sont d'autant plus importantes que la température est basse (communauté bactérienne) ou que l'humidité est importante (communauté fongique). Le regroupement des échantillons fongiques en fonction de leur composition suggère un impact du moment de prélèvement et notamment de la saison sur les résultats de biodiversité fongique. Pour la biodiversité bactérienne, aucun paramètre étudié (température, HR, nombre de salariés, tonnage de déchets...) n'a pu être identifié comme responsable des variations observées.

Les travaux de la thèse ont permis de caractériser et de déployer un processus de mesure permettant l'analyse de la biodiversité microbienne des bioaérosols émis au poste de travail (centre de tri) par une approche de métagénomique. Les données collectées ont permis d'améliorer les connaissances sur la biodiversité microbienne, ses déterminants ainsi que sur la stratégie de mesure

à adopter pour la caractérisation de la biodiversité. Les résultats obtenus ouvrent des perspectives de recherche supplémentaires sur des sujets qui n'ont pas pu être traités dans le temps imparti pour la thèse. Dans le cadre de l'étude, les techniques NGS (séquençage de séquences courtes de marqueurs n'ayant pas une bonne résolution au niveau de l'espèce) n'ont pas permis la caractérisation de la biodiversité au niveau de l'espèce et l'évaluation du risque biologique ne peut pas être réalisée avec la pertinence requise avec ces méthodes. Aussi les NGS, qui permettent de caractériser la biodiversité dans sa globalité, pourraient être couplées avec des techniques plus précises telles que des PCR spécifiques ou des méthodes traditionnelles comme la culture suivie d'une identification par spectrométrie de masse (MALDI-TOF). De même, le séquençage à haut débit étant une méthode qualitative, un couplage avec des qPCR, ciblant différents taxons, permettraient également d'avoir des informations sur les concentrations de chacun des taxons majoritaires. Par ailleurs, la méthode d'extraction d'ADN a montré ses limites lors des expérimentations de laboratoire notamment pour extraire l'ADN d'*Aspergillus niger*. Cette étape pourrait être optimisée pour permettre une bonne efficacité d'extraction pour des organismes avec une paroi plus rigide (spores). Enfin, un grand nombre d'échantillons et de données environnementales ont été collectés. Malgré cela, les informations obtenues n'ont pas été suffisantes pour expliquer l'origine de la variation de la biodiversité bactérienne. Des études supplémentaires explorant d'autres hypothèses (la composition et le temps de séjour des déchets) apparaissent nécessaires pour approfondir les premières observations. Certains taxons sont observés toute l'année dans les centres de tri en abondance supérieure à celle de la référence. Pour confirmer ces taxons comme étant des indicateurs de l'activité de tri, d'autres centres de tri doivent être investigués.

En dépit de ces limites, les travaux issus de la thèse ont apporté une nouvelle technique d'analyse au laboratoire. Les techniques de NGS constituent une méthode intéressante pour investiguer la globalité de la communauté microbienne dans les bioaérosols émis dans des environnements professionnels pas ou peu investigués. Une meilleure connaissance de la composition des bioaérosols permettrait à terme de mieux comprendre la relation entre les expositions des travailleurs et les effets induits sur la santé.

Résumé

Diversité microbienne dans les bioaérosols émis dans les centres de tri des déchets

Le secteur du tri des déchets est en pleine expansion. De part la nature de leurs activités, les centres de tri des déchets sont une source d'émission de bioaérosols dont l'exposition peut entraîner diverses troubles sur la santé des travailleurs. La composition des bioaérosols dans les centres de tri est peu documentée. Dans ce contexte, les objectifs de la thèse étaient de caractériser et de déployer dans un centre de tri (pour un suivi d'un an) une méthode d'analyse de la biodiversité microbienne dans les bioaérosols par séquençage à haut débit. Les travaux ont permis de connaître les avantages et les limites de plusieurs méthodes d'analyse de la biodiversité et de mettre en lumière la nécessité de standardiser un processus de mesure dans le cadre d'études de comparaison. Le suivi de la biodiversité microbienne dans les bioaérosols émis en centre de tri a permis de mettre en évidence la grande complexité et la variabilité des taxons bactériens et fongiques à différents postes de l'entreprise. L'analyse statistique a mis en évidence le caractère multifactoriel de la variation et de la composition des bioaérosols émis en environnement professionnel. La quantité importante de données a permis d'améliorer les connaissances sur la composition des bioaérosols émis en centre de tri des déchets et sur la stratégie de prélèvement à adopter pour une évaluation du risque biologique représentative de l'entreprise.

Mots clé : biodiversité microbienne, bioaérosols, centre de tri des déchets, stratégie de prélèvements, séquençage à haut débit

Abstract

Microbial diversity in bioaerosols emitted in waste sorting plants

The waste sorting activities is constantly increasing. Due to the nature of their activities, waste sorting plants are a source of bioaerosol emissions whose exposure can lead to various health problems for workers. The composition of bioaerosols in sorting centers is poorly documented. In this context, the aims of the thesis were to characterize and deploy in a sorting center (for a follow-up of one year) a method of analysis of microbial biodiversity in bioaerosols using high throughput sequencing. The work provided information about the advantages and the limits of several methods of analysis of the biodiversity and highlighted the need to standardize a process of measurements for comparative studies. The monitoring of microbial biodiversity in bioaerosols emitted in a sorting plant revealed the high complexity and the variability of bacterial and fungal taxa at different places in the company. Statistical analysis highlighted the multifactorial nature of the variation and composition of bioaerosols emitted in this occupational environment. The large amount of collected data improved the knowledge on the composition of bioaerosols emitted in the waste sorting plant and the sampling strategy to be conducted for a representative biological risk assessment in the company.

Keywords: microbial biodiversity, bioaerosols, waste sorting plant, sampling strategy, high throughput sequencing