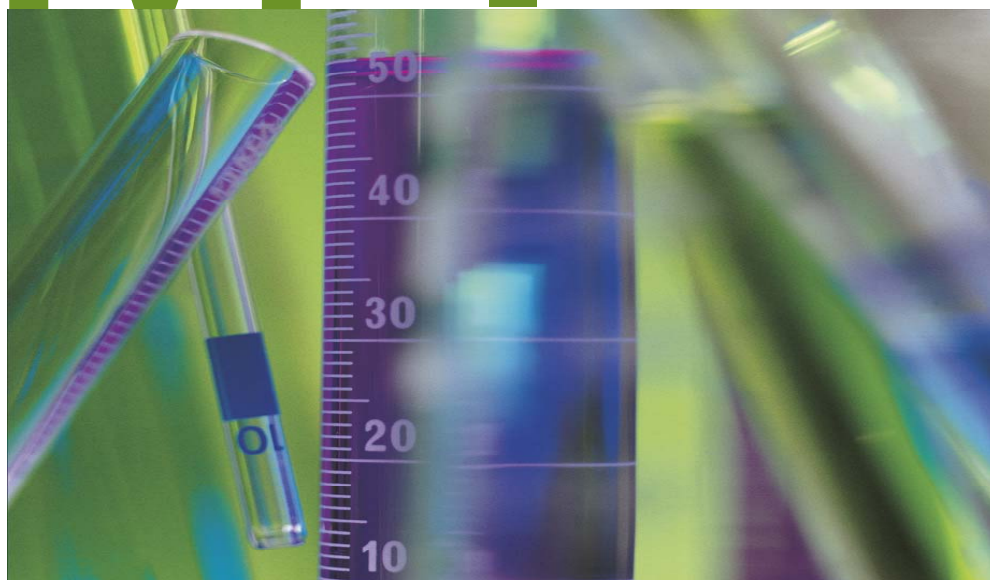


# M

## Méthodes de laboratoire

Préparation des échantillons de matrices  
solides ou liquides – Évaluation  
des bactéries et moisissures cultivables

MÉTHODE ANALYTIQUE 342



### **Applicabilité**

*Cette méthode est utilisée pour faire l'évaluation de la flore bactérienne et mycologique cultivable présent dans les échantillons de matrice solide ou liquide.*

### **Norme(s)<sup>1</sup>**

*Aucune norme.*

### **Système d'échantillonnage**

*Contenant stérile et outil stérile.*

### **Volume et débit d'échantillonnage recommandés**

*N.A.*

### **Analyse**

*N.A.*

### **Valeur minimale rapportée (VMR)**

*N.A.*

### **Domaine d'application**

*N.A.*

### **Fidélité**

*N.A.*

### **Incertitude analytique (CV<sub>A</sub>)**

*N.A.*



Solidement implanté au Québec depuis 1980, l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) est un organisme de recherche scientifique reconnu internationalement pour la qualité de ses travaux.

## NOS RECHERCHES

### Mission *travaillent pour vous !*

Contribuer, par la recherche, à la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles ainsi qu'à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes.

Offrir les services de laboratoires et l'expertise nécessaires à l'action du réseau public de prévention en santé et en sécurité du travail.

Assurer la diffusion des connaissances, jouer un rôle de référence scientifique et d'expert.

Doté d'un conseil d'administration paritaire où siègent en nombre égal des représentants des employeurs et des travailleurs, l'IRSST est financé par la Commission de la santé et de la sécurité du travail.

### Pour en savoir plus

Visitez notre site Web ! Vous y trouverez une information complète et à jour. De plus, toutes les publications éditées par l'IRSST peuvent être téléchargées gratuitement. [www.irsst.qc.ca](http://www.irsst.qc.ca)

Pour connaître l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine Prévention au travail, publié conjointement par l'Institut et la CSST. Abonnement : 1-877-221-7046

### Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales  
2008  
ISBN : 978-2-89631-256-6 (PDF)  
ISSN : 0820-8395

IRSST - Direction des communications  
505, boul. De Maisonneuve Ouest  
Montréal (Québec)  
H3A 3C2  
Téléphone : 514 288-1551  
Télécopieur : 514 288-7636  
[sac.labo@irsst.qc.ca](mailto:sac.labo@irsst.qc.ca)  
[www.irsst.qc.ca](http://www.irsst.qc.ca)  
© Institut de recherche Robert-Sauvé  
en santé et en sécurité du travail,  
2008



# Méthodes de laboratoire

## Préparation des échantillons de matrices solides ou liquides – Évaluation des bactéries et moisissures cultivables

■ MÉTHODE ANALYTIQUE 342

### Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document.

En aucun cas l'IRSST ne saurait être tenu responsable pour tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information.

Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle.

Les méthodes d'analyses ou d'étalonnage sont celles mises au point ou retenues par l'IRSST pour l'exécution de ses différents mandats. Elles peuvent requérir l'utilisation de matériels, d'opérations ou d'équipements dangereux. Ces méthodes n'ont pas pour but de mentionner tous les problèmes de sécurité associés avec leur utilisation. C'est la responsabilité de l'utilisateur d'établir les pratiques de santé et de sécurité appropriées. L'utilisation des données incluses dans ces méthodes se fera aux seuls risques de l'utilisateur : l'IRSST se dégage de toute responsabilité relative aux erreurs ou aux dommages qui découleraient de telle utilisation et de telle application. Les hyperliens qui apparaissent dans ce document ont été validés au moment de la publication

### Responsable technique de la méthode

*Geneviève Marchand, Ph.D.  
microbiologiste, professionnelle scientifique  
Services et expertises de laboratoire*

### Approbation

*Geneviève Marchand, professionnelle scientifique  
Services et expertises de laboratoire*

*Marie-Claude Barrette, responsable qualité  
Services et expertises de laboratoire*

*Jacques Lesage, directeur  
Services et expertises de laboratoire*

### Autorisation pour publication

*Alain Lajoie, directeur  
Direction de la recherche et de l'expertise*



Cette publication est disponible  
en version PDF  
sur le site Web de l'IRSST.  
[www.irsst.qc.ca](http://www.irsst.qc.ca)

Ce document technique a été financé par l'IRSST. Les conclusions et recommandations sont celles des auteurs.

**CONFORMÉMENT AUX POLITIQUES DE L'IRSS**

Les résultats des travaux de recherche publiés dans ce document  
ont fait l'objet d'une évaluation par des pairs.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Préambule</b> .....	<b>4</b>
<b>1. Principe de la méthode</b> .....	<b>5</b>
<b>2. Interférences</b> .....	<b>5</b>
<b>3. Matériel</b> .....	<b>5</b>
3.1 Échantillonnage .....	5
<b>4. Réactifs</b> .....	<b>6</b>
<b>5. Échantillonnage</b> .....	<b>6</b>
<b>6. Protocole analytique</b> .....	<b>6</b>
6.1 Extraction des microorganismes contenus dans une matrice solide .....	6
6.2 Extraction des microorganismes dans les matrices liquides .....	7
<b>7. Paramètres d'application</b> .....	<b>7</b>
7.1 Limite de détection et limite de quantification .....	7
7.2 Fidélité .....	7
7.3 Exactitude .....	7
7.4 Incertitude de mesure .....	7
<b>8. Santé et Sécurité</b> .....	<b>8</b>
<b>9. Références</b> .....	<b>8</b>
<b>10. Bibliographies</b> .....	<b>8</b>

## Préambule

La [Loi sur la santé et la sécurité du travail](#) au Québec a comme objet l'élimination à la source des dangers pour la santé, la sécurité et l'intégrité physique des travailleurs. Des valeurs d'exposition admissibles (VEA) aux substances chimiques ont été fixées à l'annexe 1 du [Règlement sur la santé et la sécurité de travail](#) (RSST). L'article 44 de ce règlement intitulé « Méthodes » spécifie que :

*« ... Ces gaz, ces fumées, ces vapeurs, ces poussières et ces brouillards présents dans le milieu de travail doivent être prélevés et analysés de manière à obtenir une précision équivalente à celle obtenue en appliquant les méthodes décrites dans le Guide d'échantillonnage des contaminants de l'air en milieu de travail publié par l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail ... »*

Pour atteindre ces objectifs, des méthodes d'analyse visant à quantifier le degré d'exposition des travailleurs sont développées et rédigées pour implanter les moyens de contrôle adéquats. Afin d'assister les intervenants en milieu de travail, l'IRSST publie, révisé périodiquement et diffuse le [Guide d'échantillonnage des contaminants de l'air en milieu de travail](#) et la direction Services et expertises de laboratoire publie des méthodes d'analyses des contaminants.

Ces méthodes doivent être utilisées de concert avec les références réglementaires et normatives suivantes :

- ✓ *Loi sur la santé et la sécurité du travail*. L.R.Q., chapitre S-2.1. Éditeur officiel du Québec, (1<sup>er</sup> août 2007). [http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=2&file=/S\\_2\\_1/S2\\_1.html](http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=2&file=/S_2_1/S2_1.html)
- ✓ *Règlement sur la santé et la sécurité du travail*. S-2.1, r.19.01, Décret 885-2001. Éditeur officiel du Québec (25 juillet 2007). [http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=2&file=%2F%2FS\\_2\\_1%2FS2\\_1R19\\_01.htm](http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=2&file=%2F%2FS_2_1%2FS2_1R19_01.htm)
- ✓ *Guide d'échantillonnage des contaminants de l'air en milieu de travail*. Direction des opérations, IRSST, T-06 Guide technique, Montréal, Québec, (mars 2005). <http://www.irsst.qc.ca/files/documents/PubIRSST/T-06.pdf>
- ✓ NIOSH, National Institute for Occupational Safety and Health .
- ✓ ISO Guide 30, Termes et définitions utilisés en rapport avec les matériaux de référence, 2<sup>e</sup> édition, 1992.
- ✓ ISO, Vocabulaire international des termes fondamentaux et généraux de métrologie, 2<sup>e</sup> édition, 1993.
- ✓ American Industrial Hygiene Association (AIHA), organisme qui accrédite le laboratoire de l'IRSST dans le domaine de l'analyse des contaminants chimiques en milieu de travail et pour l'analyse environnementale microbiologique.

Par ailleurs, toute la terminologie utilisée dans cette méthode est décrite dans l'instruction de travail « I-G-014 » du système de gestion documentaire associée au système qualité de l'IRSST.

## 1. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

L'échantillon de quelques grammes de matrice solide ou quelques millilitres de matrice liquide est déposé dans un contenant stérile à l'aide d'outils stériles. L'échantillon ainsi prélevé est soumis à une extraction avant d'être analysé afin d'en déterminer la population microbienne cultivable qui s'y retrouve.

## 2. INTERFÉRENCES

La sensibilité de cette méthode varie selon :

- ✓ La rencontre des conditions de croissance des microorganismes à leur développement.
- ✓ L'envahissement de microorganismes pouvant inhiber ou ralentir la croissance des autres microorganismes.
- ✓ La production de toxines par certaines espèces pouvant inhiber la croissance de certains autres microorganismes.

Toutes ces conditions entraînent une sous-évaluation du nombre réel de microorganismes contenus dans la matrice.

Une interférence produite par la présence d'un microorganisme envahissant sur une partie restreinte du pétri peut être contrée en dénombrant la fraction du pétri exempt de l'envahissement et en multipliant le résultat par l'inverse de la fraction dénombrée.

## 3. MATÉRIEL

### 3.1 Échantillonnage

- ✓ Contenant stérile (ex. tube à centrifuger)
- ✓ Éthanol 70 %
- ✓ Parafilm
- ✓ Étiquette de numéro d'échantillon
- ✓ Gants

### 3.2 Matériel de laboratoire

- ✓ Gélose
  - Trypticase Soya (bactérie)
  - Extrait de malt (moisissure)
  - Mac Conkey (bactéries Gram-négatives)
  - Autres selon les besoins
- ✓ Bâton d'étalement
- ✓ Tube à centrifuger
- ✓ Tube stérile
- ✓ Pipettes
- ✓ Embouts
- ✓ Incubateur ( $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ )

- ✓ Réfrigérateur à température constante 4°C ± 3°C
- ✓ Autoclave (121°C, 15 PSI)
- ✓ Gants

#### 4. RÉACTIFS

- ✓ Eau peptonée 0,01% stérile
- ✓ Tween 20
- ✓ Huile à immersion

#### 5. ÉCHANTILLONNAGE

La surface suspectée d'être contaminée par des microorganismes est prélevée à l'aide d'outils stériles et déposé dans un contenant stérile (ex. Tube à centrifuger)

Il n'est pas nécessaire de fournir un témoin.

Pour plus de détails sur la préparation du matériel d'échantillonnage, l'étalonnage et la stratégie utilisée, se référer au Guide d'échantillonnage de l'IRSST<sup>1</sup>.

#### 6. PROTOCOLE ANALYTIQUE

##### 6.1 Extraction des microorganismes contenus dans une matrice solide

- 6.1.1 Si la matrice le permet, la matière solide est pesée, environ 0.1g, et transférée dans un tube à centrifuger contenant 5 à 20 mL d'eau peptonée 0.01% (BBL) stérile additionnée de 0.05% Tween 20. Selon le type de matrice ou les besoins de l'analyse, il peut arriver qu'une évaluation quantitative ne soit pas réalisable ou nécessaire. Dans une telle situation, le transfert des microorganismes peut se faire directement sans pesée de la matrice au milieu de culture.
- 6.1.2 Agiter le tube 20 minutes.
- 6.1.3 Diluer l'échantillon 1 :10 pour obtenir une solution d'extraction dont les concentrations attendues sont entre 30 et 300 colonies sur chaque milieu de croissance<sup>2</sup>. Étaler au moins trois dilutions. Le volume d'étalement est de 100 µl. Chaque concentration est étalée en triplicata. Les pétris sont incubés aux températures requises pour la croissance des microorganismes recherchés après l'étalement.

## 6.2 Extraction des microorganismes dans les matrices liquides

Diluer l'échantillon 1 :10 pour obtenir une solution d'extraction dont les concentrations attendues sont entre 30 et 300 colonies sur chaque milieu de croissance <sup>2</sup>. Étaler au moins trois dilutions. Le volume d'étalement est de 100 µl. Chaque concentration est étalée en triplicata. Les pétris sont incubés aux températures requises pour la croissance des microorganismes recherchés après l'étalement. Un échantillon de liquide peut être étalé directement sur une gélose. Pour des concentrations très faibles, une concentration par filtration ou par centrifugation peut s'avérer nécessaire.

Se référer aux méthodes de dénombrement (no 264 et/ou 368) et d'identification (no 340 et/ou 341) pour les analyses.

## 7. PARAMÈTRES D'APPLICATION

### 7.1 Limite de détection et limite de quantification

Non applicable

### 7.2 Fidélité

Non applicable

### 7.3 Exactitude

Non applicable

### 7.4 Incertitude de mesure

Non applicable

## 8. SANTÉ ET SÉCURITÉ

### 8.1 Déversement mineur :

Lors d'un petit déversement (quelques pétris) de microorganismes le technicien doit mettre un produit désinfectant (Alcool, Eau Javel...) sur la surface contaminée ensuite recouvrir puis quitter le laboratoire environs 30 minutes pour que les particules se déposent. Mettre une affiche sur la porte du laboratoire afin d'en limiter l'accès si nécessaire. Après trente minutes, bien nettoyer la surface. Il faut autoclaver tout le matériel qui a été en contact avec le contaminant.

### 8.2 Déversement majeur :

Lors d'un gros déversement (plusieurs pétris) le technicien doit sortir du laboratoire, mettre une affiche sur la porte pour limiter l'accès au laboratoire, aviser le professionnel responsable et son supérieur. Après 30 minutes d'attente pour que les particules se déposent, il faut mettre un produit désinfectant (Alcool, Eau Javel...) sur la surface contaminée et recouvrir pour laisser agir. Après une trentaine de minutes, bien nettoyer la surface contaminée. Il faut autoclaver tout le matériel qui a été en contact avec le contaminant. **Le port du masque N-95 est nécessaire lors du nettoyage.** Dépendant de l'ampleur du déversement le professionnel responsable pourrait demander que toute les surfaces (mur, comptoir, bêcher...) ayant pu être mises en contact avec le contaminant soient décontaminés.

## 9. RÉFÉRENCES

- 1 *Guide d'échantillonnage des contaminants de l'air en milieu de travail.* Direction des opérations, IRSST, T-06 Guide technique, Montréal, Québec, (Février 2005).  
<http://www.irsst.qc.ca/files/documents/PubIRSST/T-06.pdf>
- 2 *Microbiological Methods*, Collins, C.H., Sixth Edition, Butterworths, London. 409p. 1989.

## 10. BIBLIOGRAPHIES

- 1 *Assessing Bioaerosols in Indoor Environment*, Workshop sponsored by the University of Michigan and ACGIH, Oct. 4-6, 1988, Ann Arbor, Michigan.
- 2 *Manual of Environmental Microbiology*, Hurst, C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D. et Walter, M.V., , ASM Press, 1997, 894 p.