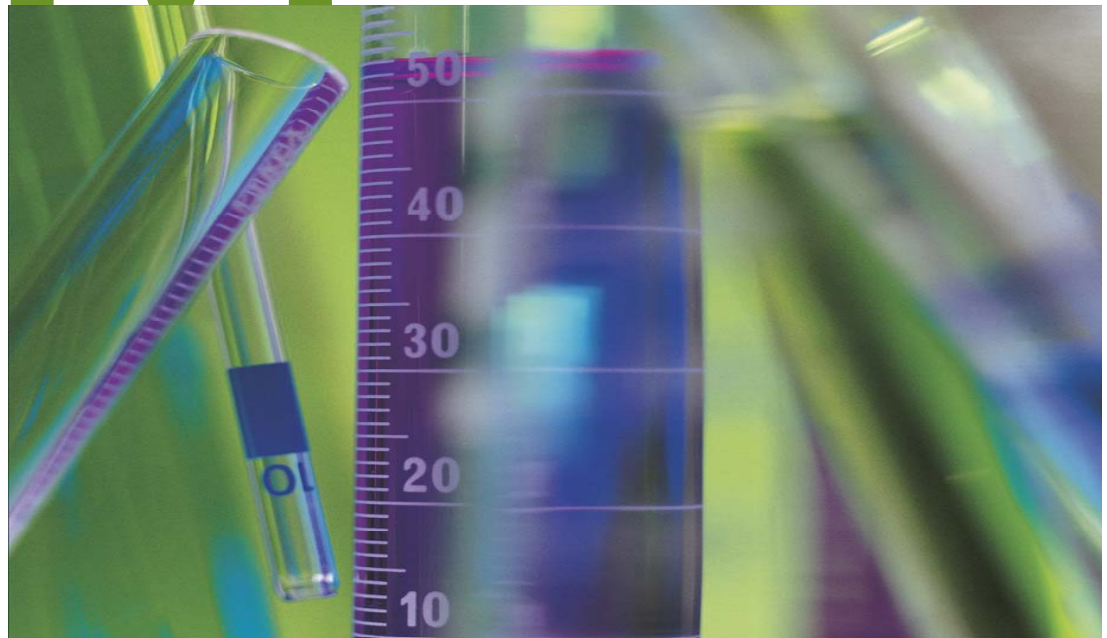


M

Méthodes de laboratoire

Dénombrement des bactéries
et moisissures cultivables de l'air
prélevées sur filtre de polycarbonate

MÉTHODE ANALYTIQUE 368



Applicabilité

Cette méthode est utilisée pour dénombrer des bactéries et moisissures viables.

Norme(s)¹

Aucune norme.

Système d'échantillonnage

Cassette avec filtre de polycarbonate.

Volume et débit d'échantillonnage recommandés

Volume: 40 litres.

Débit: 2 L/min.

Analyse

Stéréomicroscopie à fibre optique.

Valeur minimale rapportée (VMR)

1600 UFC/m³.

Domaine d'application

5300 UFC/m³.

La limite supérieure dépend de la dilution de l'échantillon avant l'étalement.

Fidélité

9,4 % répétabilité; 6,4 % répliquabilité

Incertitude analytique (CV_A)

22%.



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

travaillent pour vous !

Mission

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

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
2011
ISBN : 978-2-89631-258-0 (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
publications@irsst.qc.ca
www.irsst.qc.ca
© Institut de recherche Robert-Sauvé
en santé et en sécurité du travail,
2011

Méthodes de laboratoire

Dénombrement des bactéries et moisissures cultivables de l'air prélevées sur filtre de polycarbonate

MÉTHODE ANALYTIQUE 368

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. Ce document est également disponible sur la site Web de l'IRSST à l'adresse suivante:
http://www.irsst.qc.ca/fr/methodes_par_type.html



Cette publication est disponible
en version PDF
sur le site Web de l'IRSST.
www.irsst.qc.ca

Responsable technique de la méthode

*Geneviève Marchand, Ph.D.,
microbiologiste,*

Service soutien à la recherche et à l'expertise, IRSST

Approbation

*Geneviève Marchand, Ph.D.,
microbiologiste,*

Service soutien à la recherche et à l'expertise, IRSST

*Marie-Claude Barrette, M.Sc. chimiste,
responsable du programme d'assurance qualité,
Services et expertises de laboratoire, IRSST*

*Jacques Lesage, M.Sc. chimiste,
directeur,
Services et expertises de laboratoire, IRSST*

Autorisation pour publication

*Marie Larue, M.Sc.,
présidente-directrice générale,
Présidence-direction générale, IRSST*

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

CONFORMÉMENT AUX POLITIQUES DE L'IRSST

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

TABLE DES MATIÈRES

Préambule	1
1. Principe de la méthode	2
2. Interférences.....	2
3. Matériel	2
4. Réactifs.....	3
5. Échantillonnage	3
6. Protocole analytique.....	4
6.1 Extraction des microorganismes prélevés sur les filtres de polycarbonate 0,8 µm	4
6.2 Dénombrement	4
7. Paramètres d'application.....	5
7.1 Limite de détection (LD) et limite de quantification (LQ)	5
7.3 Exactitude	5
7.4 Désorption /récupération	6
8. Contrôle de qualité	6
9. Calculs	6
10. Santé et sécurité	7
10.1 Déversement mineur :	7
10.2 Déversement majeur :	7
11. Références	7
12. Bibliographie	7
Annexe 1 : Échantillonnage avec cassette munie d'un filtre de polycarbonate	8

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^{er} août 2007). 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
- ✓ *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^e édition, 1992.
- ✓ ISO, Vocabulaire international des termes fondamentaux et généraux de métrologie, 2^e 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

Faire un dénombrement bactérien ou mycologique à partir d'un prélèvement fait sur filtre de polycarbonate. Cette méthode permet d'analyser une concentration plus élevée de microorganismes (>5300 UFC/m³) que la méthode utilisant l'impacteur de marque Andersen (Méthode IRSST 264).

La méthode utilisée permet le dénombrement des microorganismes viables, c'est-à-dire, ceux qui ont la capacité de se développer sur les milieux de culture utilisés et ce, aux conditions de croissance fournies (température, oxygène, humidité, lumière, etc...).

2. INTERFÉRENCES

La sensibilité de cette méthode varie selon :

- ✓ La rencontre des conditions de croissance des microorganismes à leur développement;
- ✓ Le manque de nutriments pour les microorganismes lorsque les concentrations sont très élevées (les espèces à croissance rapide seront avantagées);
- ✓ Une surpopulation sur un pétri qui rend le dénombrement imprécis;
- ✓ 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 viables.

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

- ✓ Cassette en trois sections de polyéthylène;
- ✓ Filtre de polycarbonate 37mm 0,8 µm (OSMONIC K08CP03700);
- ✓ Support de cellulose (SKC 225-27);
- ✓ Pince;
- ✓ Éthanol 70% v/v;
- ✓ Étiquette de numéro d'échantillon;
- ✓ Bande de cellulose (millipore # AP4003705);
- ✓ Pompe d'échantillonnage;
- ✓ Débitmètre.

3.2 Matériel de laboratoire

- ✓ Stéréo microscope 20X-120X;
- ✓ Source lumineuse à fibre optique;
- ✓ Maxi-Vortex;
- ✓ Crayon compteur;
- ✓ Bâton d'étalement ;
- ✓ Pipette ;
- ✓ Tubes stériles ;
- ✓ Incubateur ($37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) ;
- ✓ Réfrigérateur à température constante ($4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) ;
- ✓ Autoclave (121°C , 15 PSI).

4. RÉACTIFS

- ✓ Eau peptonée 0,01% stérile (BD 299111) (Fluide A);
- ✓ Tween 20.
- ✓ Gélose à l'extrait de Malt pH 4.7 (Oxoid MP1323, *commande spéciale*)
- ✓ Gélose tryptone soja (T.S.A.) (Oxoid MP2010)
- ✓ Gélose Mac Conkey (Oxoid MP1312)

5. ÉCHANTILLONNAGE

5.1 Échantillonnage de concentrations faibles à moyennes ($<10^4$ UFC/m³)

Voir la méthode IRSST 264 *Dénombrement des bactéries et moisissures cultivables prélevées à l'aide d'un impacteur N6 de marque Andersen.*

5.2 Échantillonnage de hautes concentrations ($>10^4$ UFC/m³)

Pour les endroits à hautes concentrations, le prélèvement est fait sur filtre de polycarbonate ayant une porosité de 0,8 μm . Un volume connu d'air y est aspiré à un débit de 2 L/min. Les microorganismes recueillis sur le filtre sont extraits et étalés sur la gélose. La méthode de prélèvement sur filtre est décrite à l'annexe 1.

5.3 Contrôles

Toujours faire un prélèvement dans l'air extérieur pour pouvoir s'y comparer.

Toujours faire un témoin, c'est à dire un contrôle négatif. On recommande un témoin à tous les 10 échantillons.

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'IRSST¹.

6. PROTOCOLE ANALYTIQUE

6.1 Extraction des microorganismes prélevés sur les filtres de polycarbonate 0,8 µm

- 6.1.1 Par l'orifice de prélèvement de la cassette, ajouter 5 mL d'une solution d'eau peptonée 0,01% (Fluid A) stérile additionnée de 0,05% Tween 20.
- 6.1.2 Agiter la cassette 5 minutes au maxi-vortex à une vitesse 1200 rpm.
- 6.1.3 Diluer la suspension d'extraction si nécessaire pour obtenir une suspension dont les concentrations attendues sont entre 30 et 300 colonies pour les bactéries et 10 et 100 pour les moisissures sur chaque milieu de croissance². Des dilutions 1/10 sont habituellement réalisées. Étaler en triplicatas chaque dilution. Le volume d'étalement est de 100 µL. Les pétris sont incubés aux températures requises pour la croissance des microorganismes recherchés après l'étalement tel que décrit au tableau 1.

Tableau 1 : Conditions habituelles de croissance

	Gélose	Température d'incubation	Durée d'incubation
Moisissures	Extrait de malt (pH 4,7)	25 °C	5-10 jours
Bactéries Totales (BHA)	Tryptone Soja Agar (TSA)	37 °C	24-72 heures
Bactéries à Gram négatif	Mac Conkey	37 °C	24-72 heures

6.2 Dénombrement

Toutes les colonies présentes sur le pétri sont dénombrées à l'aide d'un stéréomicroscope et d'une source lumineuse à fibre optique. La technique des comptes de surface permet de connaître le nombre d'unités prélevées pouvant former une colonie (UFC). Selon cette technique, chaque colonie formée à la surface de la gélose provient d'une bactérie (moisissures) ou d'un agrégat de bactéries (moisissures). Cette méthode ne tient compte que des microorganismes viables qui peuvent se développer dans les conditions de croissance utilisées.

À l'aide d'un crayon gras indélébile muni d'un compteur électronique, marquer la colonie une fois qu'elle a été comptée. Si le nombre de colonies est très élevé, compter seulement une fraction de la surface et multiplié son résultat par l'inverse de cette fraction pour obtenir le compte total.

7. PARAMÈTRES D'APPLICATION

7.1 Limite de détection (LD) et limite de quantification (LQ)

7.1.1 **Limite de détection (LD)** : La limite de détection de la méthode d'analyse a été calculée à 1600 UCF/m³ d'air pour un volume prélevé de 40L. Elle se définit comme étant la concentration équivalente à trois fois l'écart-type calculé à partir de 10 mesures effectuées sur un échantillon additionné avec une suspension bactérienne située sur une concentration faible près de la limite d'une détection possible.

7.1.2 **Limite inférieure de quantification** : La limite de quantification inférieure de la méthode d'analyse est de 5300 UFC/m³. Elle se définit comme étant la concentration équivalente à dix fois l'écart-type calculé à partir de 10 mesures effectuées sur un échantillon additionné avec une suspension bactérienne située sur une concentration faible près de la limite d'une détection possible.

7.2 Fidélité

7.2.1 Répétabilité

La répétabilité a été déterminée pour quatre concentrations de bactéries. Pour chaque concentration, 6 filtres ont été additionnés de la même suspension bactérienne et ont été soumis à la méthode d'extraction et d'analyse. Elle a été évaluée à l'aide d'analyses effectuées par trois techniciennes. La répétabilité correspond à 9,4%.

7.2.2 Réplicabilité

La répliquabilité a été déterminée pour quatre concentrations de bactéries. Pour chaque concentration, 6 filtres ont été additionnés de la même suspension bactérienne et soumis à la méthode d'extraction et d'analyse. La répliquabilité correspond à 6,4%.

7.3 Exactitude

L'exactitude de la méthode analytique est vérifiée à l'aide de 10 valeurs d'une même concentration. La valeur cible de la concentration est la moyenne de 6 filtres additionnés de la même suspension bactérienne. L'exactitude est de 83,1%.

7.4 Désorption /récupération

Un test de désorption/récupération a été réalisé pour quatre (4) concentrations différentes de suspensions bactériennes. Pour chaque concentration, sept (7) aliquotes ont été ajoutées sur des filtres de polycarbonate. Après séchage des aliquotes, les filtres ont été soumis à la méthode d'extraction et d'analyse. Toutes les analyses ont été réalisées, par le même analyste et sur le même appareil. Les résultats obtenus sont présentés au tableau 2.

Tableau 2 : Test de désorption / récupération (n=7)

Concentration (EU/mL)	8,9E6	2,86E5	8,59E5	1,13E7
Coefficient de dés / rec (%)	79,26	106,34	101,43	81,99

Moyenne de récupération : 92%

8. CONTRÔLE DE QUALITÉ

Un contrôle de dénombrement est effectué pour calculer la variation de chaque compteur ainsi que celle entre différents compteurs. Pour effectuer ce contrôle, un échantillon est retenu après chaque groupe de vingt (20) dénombrements.

Un contrôle terrain est analysé lorsque fourni par le client afin de s'assurer qu'aucune contamination n'a eu lieu lors de l'échantillonnage et du transport.

Un contrôle d'extraction est analysé à chaque jour d'analyse pour s'assurer qu'aucune contamination n'a eu lieu lors des manipulations.

9. CALCULS

Pour obtenir les résultats en UFC/m³, le nombre de colonies obtenu sur le pétri doit être converti en colonie sur filtre, suivant l'équation ci-dessous :

$$\text{colonies sur filtre} = \frac{\text{nombre de colonies sur pétri}}{\text{volume d'étalement (mL)}} \times \text{volume d'extraction (mL)}$$

Puis, c'est à partir du nombre de colonies sur filtre que la concentration de UFC/m³ est calculée, selon l'équation suivante :

$$UFC/m^3 = \frac{\text{nombre de colonies sur filtre}}{\text{volume d'air filtré en L}} \times \frac{1000 L}{m^3}$$

10. SANTÉ ET SÉCURITÉ

10.1 Déversement mineur :

Lors d'un petit déversement (quelques pétris) de microorganismes, le technicien doit mettre un produit désinfectant (alcool, eau de javel...) sur la surface contaminée. Recouvrir ensuite, puis quitter le laboratoire pendant environ trente (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 ce trente minutes, bien nettoyer la surface. Il faut autoclaver tout le matériel qui a été en contact avec le contaminant.

10.2 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, puis aviser le professionnel responsable et son supérieur. Après 30 minutes d'attente pour que les particules se soient déposées, il faut mettre un produit désinfectant (alcool, eau de 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 d'un masque N-95 est nécessaire lors du nettoyage.** Selon l'ampleur du déversement, le professionnel responsable pourrait demander que toutes les surfaces (murs, comptoirs, béciers...) ayant possiblement été en contact avec le contaminant soient décontaminés.

11. 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.
- 3 *Operating Manual for Andersen Sampler*. Viable (microbial) Particle Sizing Sampler., TR#76-900042, november 1984.

12. BIBLIOGRAPHIE

- 1 *Assessing Bioaerosols in Indoor Environment Workshop*, sponsored by the University of Michigan and ACGIH, Oct. 4-6. 1988, Ann Arbor, Michigan.

ANNEXE 1 : ÉCHANTILLONNAGE AVEC CASSETTE MUNIE D'UN FILTRE DE POLYCARBONATE

Paramètres :

- ✓ Débit : 2 L/min.
- ✓ Temps : maximum 20 minutes.
- ✓ Cassette : 37 mm.
- ✓ Filtre : polycarbonate porosité de 0,8 µm.
- ✓ Poste fixe : 1,5 mètre du sol.
- ✓ Limite de détection (pour 20 minutes de prélèvement) : 1600 UFC/m³ d'air.
- ✓ Limite de quantification (évalué à 10X l'écart-type) : 5300 UFC/m³ d'air.

Procédure :

- ✓ À l'aide d'un débitmètre, ajuster le débit de la pompe à 2 L/min.
- ✓ L'utilisation des cassettes ouvertes est souhaitable si les risques de projection sont faibles.
- ✓ Prendre la mesure du débit (avec le débitmètre) après l'échantillonnage et calculer le débit moyen.
- ✓ Manipuler les cassettes avec soin après le prélèvement.
- ✓ Acheminer aux laboratoires dans les 24 heures suivant l'échantillonnage.

Mise en garde :

- ✓ Minimiser le temps d'ouverture de la cassette.
- ✓ Le filtre ne doit jamais entrer en contact avec quoi que ce soit.
- ✓ Minimiser les mouvements près des cassettes.
- ✓ Recommencer si une toux ou un éternuement se produit durant le prélèvement.
- ✓ Les bactéries à Gram-négatif sont plus sensibles au prélèvement sur cassette, donc veuillez utiliser en dernier recours.