

## Méthode analytique

# Dénombrement des bactéries et moisissures cultivables prélevées à l'aide d'un impacteur de marque Andersen

### Responsable technique de la méthode

Audrey Bernèche-D'Amours, M. Sc., RMCCM, microbiologiste agréée et biochimiste, professionnelle scientifique, Direction des laboratoires-IRSST

### Personne(s) ayant contribué à la présente version de cette méthode

Geneviève Marchand Ph. D., RMCCM SCCM(Env), microbiologiste agréée et biochimiste, chercheuse, Prévention des risques chimiques, biologiques, mécaniques et physique - IRSST

Nancy Lacombe, technicienne de laboratoire,  
Direction des laboratoires – IRSST

Delphine Lanoie, M. Sc., microbiologiste agréée,  
professionnelle scientifique,  
Direction des laboratoires-IRSST

MÉTHODES DE  
LABORATOIRES

MA-264



### 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.

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

### Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2021  
ISBN : 978-2-89797-179-3

Lorsque imprimé, ce document est non contrôlé.  
SVP vous référer au document disponible sur support informatique

No. Révision : 5 - Date de diffusion: 2021-07-29

Lorsque imprimé, ce document est non contrôlé.  
SVP vous référer au document disponible sur support informatique

No. Révision : 5 - Date de diffusion: 2021-07-29

SUBSTANCES	CAS	CRITÈRES D'ACTION PROPOSÉS PAR L'IRSST
Bactéries totales cultivables	s. o.	• Milieu de travail : 10 000 UFC.m <sup>-3</sup> d'air
Bactéries à Gram négatif cultivables	s. o.	• Milieu de travail : 1 000 UFC.m <sup>-3</sup> d'air • Milieu non industriel : présence
Moisissures totales cultivables	s. o.	• Milieu de travail : 1 000 UFC.m <sup>-3</sup> d'air • Édifice malsain et qualité air intérieure : Concentrations intérieures > concentrations au site de référence

## APPLICABILITÉ

Bactéries totales, bactéries à Gram négatif et moisissures totales cultivables dans l'air des lieux de travail prélevées à l'aide d'un impacteur à 1 ou 6 étages de marque Andersen (ou équivalent). La méthode utilisée permet le dénombrement des microorganismes cultivables, c'est-à-dire ceux qui ont la capacité de se développer sur les milieux de culture utilisés et aux conditions de croissance fournies (température, oxygène, humidité, lumière, etc.) dans le laboratoire. L'impacteur à 6 étages permet en plus de séparer les particules en fonction de leur taille, allant de plus de 8 µm sur l'étage du haut à moins de 1 µm sur l'étage du bas, simulant ainsi la distribution des particules à travers les différentes zones du système respiratoire humain.

**Domaine** : Concentration faible à modérée de bactéries ou moisissures avec un impacteur de marque Andersen à 1 étage; de 7 Unités Formant Colonies par mètre cube (UFC.-m<sup>3</sup>) à environ 10<sup>4</sup> UFC.m<sup>-3</sup> selon la méthode de dénombrement utilisée.

Pour des concentrations élevées de bactéries ou de moisissures, il est possible de faire un prélèvement d'une minute à l'aide d'un impacteur à 6 étages afin d'éviter une croissance microbienne confluyente sur gélose. Avec ces paramètres, des concentrations de plus de 10<sup>5</sup> UFC.m<sup>-3</sup> peuvent être documentées.

**Remarque** : Le domaine d'application de la méthode est dépendant de la capacité à distinguer visuellement deux colonies. Le compteur peut dans certaines circonstances juger que le dénombrement est trop imprécis pour justifier la production d'un résultat. La concentration finale dépend du débit et de la durée d'échantillonnage.

*Alternativement : Pour des concentrations élevées de bactéries ou de moisissures, se référer à la méthode IRSST 368 Dénombrement des bactéries et moisissures cultivables de l'air prélevées sur filtre de polycarbonate. La précision de cette méthode est moindre.*

---

## LIMITATIONS ET INTERFÉRENCES

La sensibilité de cette méthode varie selon :

- La rencontre des conditions de croissance nécessaires au développement des microorganismes;
- Le manque de nutriments pour les microorganismes lorsque le nombre de colonies impactées sur la gélose est très élevé (les espèces à croissance rapide seront avantagées);
- Une surpopulation sur une gélose qui rend le dénombrement imprécis;
- L'envahissement de microorganismes pouvant inhiber ou ralentir la croissance d'autres microorganismes et/ou nuire au dénombrement des colonies;
- La production de toxines par certains microorganismes pouvant inhiber la croissance d'autres microorganismes.

Toutes ces conditions entraînent une sous-évaluation du nombre réel de microorganismes cultivables.

## PRÉLÈVEMENT

### 1) Système d'échantillonnage

<b>Support</b>	Bactéries totales : Gélose trypticase de soya (TSA) Bactéries à Gram négatif : Gélose MacConkey Moisissures : Gélose à l'extrait de malt pH 4,7 (MEA) Autres types de géloses selon les besoins d'analyse
<b>Type de dispositif</b>	Impacteur de marque Andersen - 1(N-6) ou 6 étages ou équivalent Pompe à très haut débit (30 litres) – SKC Quick Take 30 ou équivalent Débitmètre ou rotamètre

**Consigne :** Se référer à la consigne d'échantillonnage I-MAT-030 <sup>1</sup>.

### 2) Conditions de prélèvement recommandées

**Débit :** 28,3 litres par minute (L.min<sup>-1</sup>)

**Temps d'échantillonnage :** Typiquement 2 à 5 min., pouvant atteindre 30 minutes

**Volume d'échantillonnage :** 56,6 à 141,5 L

### 3) Durée de conservation testée et validée

Les échantillons doivent être reçus au laboratoire dans un délai de 48 heures après l'échantillonnage. Éviter le gel des échantillons. Si la température extérieure est supérieure à 25°C, l'ajout d'un bloc réfrigérant est recommandé pendant le transport. Le bloc réfrigérant ne doit cependant pas être en contact direct avec les géloses, par exemple en l'enroulant dans du papier essuie-mains.

### 4) Échantillon de référence (microbiote de référence)

Un prélèvement de l'air extérieur permettant de documenter le microbiote de l'air d'alimentation de la bâtisse est nécessaire pour les investigations de qualité de l'air intérieur (QAI) et est suggéré pour les évaluations de milieux de travail industriels ou du domaine de l'agriculture.

Pour les investigations de la QAI, si les conditions environnementales rendent le prélèvement de l'air extérieur impossible, prévoir un prélèvement dans un site témoin à titre de référence du microbiote présent dans un milieu non contaminé.

### 5) Échantillon témoin (blanc de terrain)

Un échantillon témoin consiste en une gélose de chaque type de milieu utilisé pour l'échantillonnage. Ce témoin sera manipulé comme l'ensemble des échantillons, mais ne sera jamais ouvert. Idéalement, prévoir au minimum un témoin pour chaque dix (10) échantillons, ou préférentiellement 1 témoin pour chaque poste de prélèvement lorsque les déplacements sont nombreux.

### 6) Détails

Se référer à la consigne d'échantillonnage I-MAT-030 <sup>1</sup>.

Pour plus d'information sur l'échantillonnage, se référer au *Guide d'échantillonnage des contaminants de l'air en milieu de travail* <sup>2</sup>.

## RÉACTIFS ET ÉTALONS

s. o.

## APPAREILLAGE ET MATÉRIEL

- Bactéries : Incubateur ajusté à  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Moisissures : Incubateur ajusté à  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Autres incubateurs selon les besoins d'analyse
- Stéréomicroscope 20X-120X
- Source lumineuse à fibre optique
- Compteur numérique ou manuel

## PRÉPARATION DE L'ANALYSE

Nombre d'étapes de préparation : 1

<b>Étape 1</b>	Incubation des échantillons aux températures correspondantes aux microorganismes à analyser, généralement pour une durée de 24 à 48 heures pour les bactéries et de 5 à 7 jours pour les moisissures.
----------------	---

## CONDITIONS ANALYTIQUES

Technique analytique : Stéréomicroscopie à fibre optique

### **Bactéries totales cultivables et Bactéries à Gram négatif cultivables (compte global):**

À l'aide d'un stéréomicroscope muni d'une source lumineuse à fibre optique et d'un compteur numérique, dénombrer toutes les colonies pouvant être différenciées.

- Plusieurs colonies sur un même site d'impaction peuvent être dénombrées s'il est possible de les distinguer.
- Environ 1500 colonies bactériennes peuvent être dénombrées par gélose avec ce compte global.
- Si le nombre de colonies est très élevé ou qu'il y a présence de microorganismes envahissants rendant difficile le dénombrement, compter seulement une fraction de la surface de la gélose et multiplier le résultat obtenu par l'inverse de la fraction de la gélose dénombrée pour obtenir un dénombrement approximatif.

### **Moisissures totales cultivables (méthode des trous positifs):**

À l'aide d'un stéréomicroscope muni d'une source lumineuse à fibre optique et d'un compteur numérique, dénombrer tous les sites d'impaction où une croissance de moisissure est observée. Cette méthode est communément appelée méthode des « trous positifs ».

- La méthode des trous positifs est basée sur le principe que plus le nombre de sites d'impaction positifs augmente, plus la probabilité qu'une deuxième impaction se produise sur un site déjà impacté augmente aussi. En se basant sur la loi de poisson, la table de conversion permet de pallier au potentiel de sous-estimation des impactions multiples par site.
- Si une colonie recouvre plus d'un site d'impaction, seulement un site est enregistré comme positif.
- Une colonie située hors d'un site d'impaction n'est pas dénombrée.
- Le nombre maximal de trous positifs pouvant être compté est de 400.
- Une fois tous les sites d'impaction positifs dénombrés, une table de conversion est utilisée pour transformer cette valeur (r) en nombre de particules correspondant (P).
- L'utilisation de cette table de probabilité est nécessaire pour obtenir le nombre estimé de colonies de moisissures (P) lors de l'utilisation de la méthode des trous positifs proposée par le fabricant des appareils Andersen.

**Commentaire :**

Si une identification au genre ou à l'espèce des bactéries ou moisissures présentes est requise, un repiquage en culture pure doit être effectué pour chaque morphologie coloniale observée.

**ÉTALONNAGE**

s. o.

**CALCULS ET EXPRESSION DES RÉSULTATS**

Concentration de **bactéries totales ou à Gram négatif** cultivables dans l'air :

$$C = \frac{N}{V_{air}} \times \frac{1000 L}{m^3}$$

Où :

- C = Concentration de bactéries dans l'échantillon d'air, en **UFC.m<sup>-3</sup>**  
N = Nombre de colonies dénombrées, en **UFC**  
V<sub>air</sub> = Volume d'air échantillonné en **L**

Concentration de **moisissures** totales cultivables estimées dans l'air :

$$C = \frac{P}{V_{air}} \times \frac{1000 L}{m^3}$$

Où :

- C = Concentration de moisissures totales estimées dans l'échantillon d'air, en **UFC.m<sup>-3</sup>**  
P = Nombre de colonies estimées (P) à partir du r (nombre de trous positifs sur la gélose, voir Annexe 1), en **UFC**  
V<sub>air</sub> = Volume d'air échantillonné en **L**

**Commentaires :**

Lorsqu'une identification mycologique est effectuée, la concentration de chaque microorganisme identifié est calculée à l'aide de la méthode du compte global (dénombrement réel), alors que la concentration totale de l'échantillon est calculée par la méthode des trous positifs. Afin d'aviser qu'une partie de la concentration estimée (C) découle de la correction provenant de la table de conversion utilisée avec la méthode des trous positifs, un facteur de correction selon la probabilité de superposition (CSPS) doit être rapporté. Le CSPS est la différence entre la concentrations estimé (C) et la somme des concentrations de chacun des microorganismes identifiés.

## VALIDATION

Remarque : Ces données de validation représentent la performance de la méthode au moment de sa publication. Pour les valeurs à jour de certaines données, consulter le site Web de l'IRSST.

### Limite de détection et Limite de quantification

COMPOSÉ OU ÉLÉMENT	LIMITE DE DÉTECTION (UFC.m <sup>-3</sup> )	LIMITE DE QUANTIFICATION (UFC.m <sup>-3</sup> )
Bactéries totales cultivables	7	s. o.
Bactéries à Gram négatif cultivables	7	s. o.
Moisissures cultivables	7	s. o.

La limite de détection pour cette méthode correspond à la VMR (valeur minimale rapportée) et varie selon le volume d'échantillonnage. La limite de détection indiquée ici est pour un volume d'échantillonnage de 141,5 L (débit de 28,3 L.min<sup>-1</sup> pendant 5 min).

### Précision (Fidélité)

COMPOSÉ OU ÉLÉMENT	RÉPLICABILITÉ (%)	RÉPÉTABILITÉ (%)
Bactéries totales cultivables	0,6	4,2
Bactéries à Gram négatif cultivables	0,6	4,2
Moisissures cultivables	3,8	2,9

### Justesse

s. o.

### Récupération

s. o.

### Incertitude analytique

Remarque : Ces données représentent la performance de la méthode au moment de sa publication. Pour les valeurs d'incertitude analytique à jour, consulter le site Web de l'IRSST.

L'incertitude de mesure analytique (CV<sub>a</sub>) de la méthode est déterminée à partir de résultats individuels obtenus sur des échantillons soumis à l'ensemble de la procédure analytique. Celle-ci ne tient pas compte d'un seuil de probabilité (95 %, par exemple) ni de la contribution de l'incertitude associée à l'échantillonnage.

COMPOSÉ OU ÉLÉMENT	CV <sub>a</sub> (%)
Bactéries totales cultivables	7.2
Bactéries à Gram négatif cultivables	7.2
Moisissures cultivables	4.5

Pour information supplémentaire sur la détermination des incertitudes, se référer au [Document Explicatif pour éléments de validation de méthodes, I-G-041](#), de la Direction des laboratoires de l'IRSST.

## RÉFÉRENCES

1. Institut de recherche en santé et sécurité au travail (IRSST). « Moisissures ou bactéries – Impacteur Andersen (N6) Analyse : Dénombrement des bactéries et moisissures cultivables (méthode IRSST 264) », Consigne d'échantillonnage I-MAT-030, No. Révision 1, 2017.  
<https://www.irsst.qc.ca/media/documents/consignes/I-MAT-030.pdf>
2. Institut de recherche en santé et sécurité au travail (IRSST). « Guide d'échantillonnage des contaminants de l'air en milieu de travail », *Études et recherches*, Guide technique T-06, 8<sup>e</sup> édition (mise à jour 8.1), 2012, 191 p.  
<http://www.irsst.qc.ca/files/documents/PubIRSST/T-06.pdf>
3. Institut de recherche en santé et sécurité au travail (IRSST). « Les bioaérosols en milieu de travail : guide d'évaluation, de contrôle et de prévention », *Études et recherches*, Guide technique T-23, 2001, 72 p.  
<http://www.irsst.qc.ca/files/documents/PubIRSST/T-06.pdf>.
4. Instruction Manual Series 10-800 Six and two stage viable samplers. Part # 100072-00, oct 2009.
5. Instruction Manual Series 10-800 Single stage viable sampler. Part # 100074-00, oct 2009.
6. Andersen A. A. (1958). New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *Journal of bacteriology*, 76(5), 471–484. <https://doi.org/10.1128/JB.76.5.471-484.1958>
7. AQHSST. (2021). *Hygiène du travail- du diagnostic à la maîtrise des facteurs de risque* (2<sup>e</sup> éd.), Montréal, Canada. Modulo.

## ANNEXE 1

TABLE DE CONVERSION POUR LA MÉTHODE DES TROUS POSITIFS<sup>5,6</sup>

<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>				
1	1	41	43	81	91	121	144	161	206	201	279	241	369	281	485	321	649	361	931
2	2	42	44	82	92	122	146	162	208	202	281	242	372	282	488	322	654	362	942
3	3	43	45	83	93	123	147	163	208	203	283	243	374	283	492	323	659	363	952
4	4	44	47	84	94	124	148	164	211	204	285	244	377	284	495	324	664	364	963
5	5	45	48	85	96	125	150	165	213	205	287	245	379	285	499	325	670	365	974
6	6	46	49	86	97	126	151	166	214	206	289	246	382	286	502	326	675	366	986
7	7	47	50	87	98	127	153	167	216	207	292	247	384	287	506	327	680	367	998
8	8	48	51	88	99	128	154	168	218	208	294	248	387	288	508	328	686	368	1010
9	9	49	52	89	101	129	156	169	220	209	296	249	390	289	513	329	692	369	1023
10	10	50	53	90	102	130	157	170	221	210	298	250	392	290	516	330	697	370	1036
11	11	51	55	91	103	131	159	171	223	211	300	251	395	291	520	331	703	371	1050
12	12	52	56	92	105	132	160	172	225	212	302	252	398	292	524	332	709	372	1064
13	13	53	57	93	106	133	162	173	227	213	304	253	400	293	527	333	715	373	1078
14	14	54	58	94	107	134	163	174	228	214	306	254	403	294	531	334	721	374	1093
15	15	55	59	95	108	135	165	175	230	215	308	255	406	295	535	335	727	375	1109
16	16	56	60	96	110	136	166	176	232	216	311	256	409	296	539	336	733	376	1125
17	17	57	61	97	111	137	168	177	234	217	313	257	411	297	543	337	739	377	1142
18	18	58	63	98	112	138	169	178	236	218	315	258	414	298	547	338	746	378	1160
19	19	59	64	99	114	139	171	179	237	219	317	259	417	299	551	339	752	379	1179
20	21	60	65	100	115	140	172	180	239	220	319	260	420	300	555	340	759	380	1198
21	22	61	66	101	116	141	174	181	241	221	322	261	423	301	559	341	766	381	1219
22	23	62	67	102	118	142	175	182	243	222	324	262	426	302	563	342	772	382	1241
23	24	63	69	103	119	143	177	183	245	223	326	263	429	303	567	343	779	383	1263
24	25	64	70	104	120	144	179	184	246	224	328	264	432	304	571	344	786	384	1288
25	26	65	71	105	122	145	180	185	248	225	331	265	434	305	575	345	793	385	1314
26	27	66	72	106	123	146	182	186	250	226	333	266	437	306	579	346	801	386	1341
27	28	67	73	107	125	147	183	187	252	227	335	267	440	307	584	347	808	387	1371
28	29	68	75	108	126	148	185	188	254	228	338	268	443	308	588	348	816	388	1403
29	30	69	76	109	127	149	186	189	256	229	340	269	447	309	592	349	824	389	1438
30	31	70	77	110	129	150	188	190	258	230	342	270	450	310	597	350	832	390	1476
31	32	71	78	111	130	151	190	191	260	231	345	271	453	311	601	351	840	391	1518
32	33	72	79	112	131	152	191	192	262	232	347	272	456	312	606	352	848	392	1565
33	34	73	81	113	133	153	193	193	263	233	349	273	459	313	610	353	857	393	1619
34	36	74	82	114	134	154	194	194	265	234	352	274	462	314	615	354	865	394	1681
35	37	75	83	115	136	155	196	195	267	235	354	275	465	315	620	355	874	395	1754
36	38	76	84	116	137	156	198	196	269	236	357	276	468	316	624	356	883	396	1844
37	39	77	86	117	138	157	199	197	271	237	359	277	472	317	629	357	892	397	1961
38	40	78	87	118	140	158	201	198	273	238	362	278	475	318	634	358	902	398	2127
39	41	79	88	119	141	159	203	199	275	239	364	279	478	319	639	359	911	399	2427
40	42	80	89	120	143	160	204	200	277	240	367	280	482	320	644	360	921	400	*

\* Indique que la limite de quantification est dépassée (environ 2628)

(r) = nombre de trous positifs (sites d'impaction avec croissance)

(P) = nombre de colonies estimées