

1996

Mise au point d'une méthode d'échantillonnage des microorganismes sur filtre de polycarbonate

Geneviève Marchand
IRSST

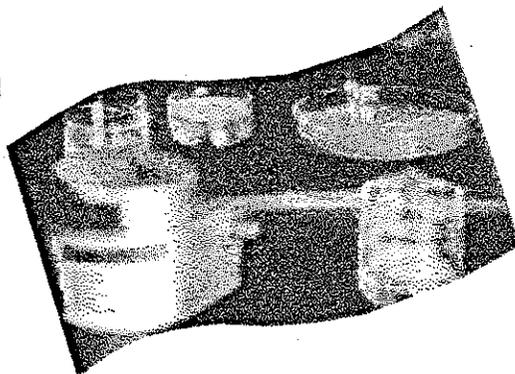
Suivez ce contenu et d'autres travaux à l'adresse suivante: <https://pharesst.irsst.qc.ca/rapports-scientifique>

Citation recommandée

Marchand, G. (1996). *Mise au point d'une méthode d'échantillonnage des microorganismes sur filtre de polycarbonate* (Rapport n° R-125). IRSST.

Ce document vous est proposé en libre accès et gratuitement par PhareSST. Il a été accepté pour inclusion dans Rapports de recherche scientifique par un administrateur autorisé de PhareSST. Pour plus d'informations, veuillez contacter pharesst@irsst.qc.ca.

**Mise au point
d'une méthode d'échantillonnage
des microorganismes
sur filtre de polycarbonate**



**ÉTUDES ET
RECHERCHES**

Geneviève Marchand

Avril 1996

R-125

RAPPORT



IRSST
Institut de recherche
en santé et en sécurité
du travail du Québec

La recherche, pour mieux comprendre

L'Institut de recherche en santé et en sécurité du travail du Québec (IRSST) est un organisme de recherche scientifique voué à l'identification et à l'élimination à la source des dangers professionnels, et à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes. Financé par la CSST, l'Institut réalise et finance, par subvention ou contrats, des recherches qui visent à réduire les coûts humains et financiers occasionnés par les accidents de travail et les maladies professionnelles.

Pour tout connaître de l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine *Prévention au travail*, publié conjointement par la CSST et l'Institut.

Les résultats des travaux de l'Institut sont présentés dans une série de publications, disponibles sur demande à la Direction des communications.

Il est possible de se procurer le catalogue des publications de l'Institut et de s'abonner à *Prévention au travail* en écrivant à l'adresse au bas de cette page.

ATTENTION

Cette version numérique vous est offerte à titre d'information seulement. Bien que tout ait été mis en œuvre pour préserver la qualité des documents lors du transfert numérique, il se peut que certains caractères aient été omis, altérés ou effacés. Les données contenues dans les tableaux et graphiques doivent être vérifiées à l'aide de la version papier avant utilisation.

Dépôt légal
Bibliothèque nationale du Québec

IRSST - Direction des communications
505, boul. de Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec)
H3A 3C2
Téléphone : (514) 288-1 551
Télécopieur: (514) 288-7636
Site internet : www.irsst.qc.ca
© Institut de recherche en santé
et en sécurité du travail du Québec,

**Mise au point
d'une méthode d'échantillonnage
des microorganismes
sur filtre de polycarbonate**

Geneviève Marchand
Programme soutien analytique, IRSST

avec la collaboration de :
Jacques Lavoie, Brigitte Roberge,
Carole Pépin et Yves Cloutier
Programme soutien analytique, IRSST

**ÉTUDES ET
RECHERCHES**

RAPPORT

Table des matières

	Page
1. Introduction	2
2. Matériel et méthodes	4
2.1. Sites de prélèvement	4
2.2. Méthodes de prélèvement	4
2.3. Méthodes d'analyses	4
2.4. Méthode de comparaison des résultats obtenus avec les deux méthodes	5
2.5. Dilution et extraction	6
3. Résultats et discussion	7
3.1 Comparaison des techniques de prélèvement: filtres de polycarbonate et impacteurs de marque Andersen	7
3.2 Méthode sur filtre : Comparaison de l'utilisation des cassettes fermées vs ouvertes	9
3.3 Méthode sur filtre: Effet du temps d'attente avant l'extraction	10
3.4 Méthode sur filtre: Vérification d'une méthode d'extraction en bouteille	10
3.5 Comparaison de différents temps de prélèvement	11
Conclusion	13
Bibliographie	14

Liste des tableaux

	Page
Tableau I: Comparaison des concentrations moyennes de bactéries obtenues avec les deux méthodes de prélèvement	7
Tableau II: Comparaison des concentrations moyennes de moisissures obtenues à l'aide des deux méthodes de prélèvement	8
Tableau III: Comparaison des concentrations moyennes de microorganismes obtenues avec les cassettes ouvertes et fermées	9
Tableau IV: Vérification du temps d'attente avant l'extraction sur les concentrations moyennes de bactéries et de moisissures	10
Tableau V: Comparaison de l'extraction en bouteille et de celle en cassette	11
Tableau VI: Comparaison des concentrations moyennes pour différents temps de prélèvement	12

1. Introduction

Les microorganismes sont présents dans l'air de tous les milieux de travail et doivent être considérés dans le cadre de certaines études en hygiène industrielle. Les effets sur la santé de certains microorganismes sont maintenant connus. Par exemple, *Legionella pneumophila* peut causer la maladie du Légionnaire ou la fièvre de Pontiac^{1,4}, les bactéries Gram-négatives peuvent causer des problèmes gastro-intestinaux et pulmonaires⁵⁻⁸, la moisissure *Histoplasma encapsulatum* peut causer des histoplasmoses^{3,9} et *Aspergillus fumigatus* peut causer des aspergilloses^{10,3,11-12}. Bien que dans la majorité des cas, les relations dose-effets n'ont pu être établies, l'exposition à des concentrations élevées de microorganismes doit être contrôlée pour prévenir les problèmes de santé. Entre autres, des problèmes pulmonaires et gastro-intestinaux ont été mis en relation avec l'exposition des travailleurs à des concentrations élevées de microorganismes¹³⁻¹⁵.

De par son orientation vers les métiers de l'environnement et l'agriculture, le programme Soutien analytique se voit fréquemment impliqué dans le contrôle des microorganismes dans des environnements où les concentrations sont initialement très élevées (porcherie, traitement des eaux usées, tri-compostage de déchets domestiques). Le but des hygiénistes industriels, à savoir le contrôle des expositions nuisibles pour les travailleurs, ne pourra être atteint que si les méthodes de prélèvement disponibles appuient leur démarche de façon efficace. Les intervenants du réseau sont eux aussi plus fréquemment impliqués dans les industries où les concentrations sont considérées élevées par rapport à celles rencontrées, par exemple, dans les édifices à bureaux.

La méthode standard de prélèvement de microorganismes de l'IRSST est bien adaptée pour les lieux où les concentrations de microorganismes dans l'air sont de faibles à moyennes¹⁶⁻¹⁷. L'impacteur de marque Andersen utilisé fonctionne selon un principe d'impaction sur un milieu gélosé. Dans les environnements où l'on retrouve des concentrations élevées, un problème de saturation du milieu gélosé rend le dénombrement très laborieux et l'identification impossible. De plus, les temps de prélèvement utilisés avec les impacteurs de marque Andersen sont très courts et peuvent entraîner des erreurs assez importantes lors du calcul des volumes d'air. Le temps nécessaire pour que l'air ambiant remplace l'air présent à l'intérieur de l'échantillonneur représente une grande fraction du temps de prélèvement lorsque celui-ci est très court. Ce qui entraîne des résultats inférieurs à la réalité¹⁷.

Peu d'appareils disponibles commercialement peuvent être utilisés de façon efficace dans les environnements où les concentrations sont élevées. Ces appareils sont considérés efficaces pour les concentrations de microorganismes variant de faibles à moyennes¹⁶. Un des appareils

pouvant être utilisé dans les endroits où les concentrations sont élevées est le barboteur de type AGI-30. Cependant, cet échantillonneur est peu adapté à l'échantillonnage sur le terrain puisqu'il est fabriqué de verre.

Plusieurs études ont déjà comparé la méthode de prélèvement sur filtre à d'autres méthodes¹⁸⁻²⁰. La méthode sur filtre a d'abord été décrite par H. Wolochow²¹. Il avait noté une perte de viabilité et un problème de récupération des microorganismes du filtre. Dans une étude faite par Thorne¹⁹, les concentrations de bactéries n'étaient pas significativement différentes entre la méthode sur filtre et l'impacteur de marque Andersen à 6 étages dans la configuration à deux pétris; par contre, pour les moisissures, les concentrations étaient significativement plus élevées avec la méthode sur filtre. Il est à remarquer que dans cette étude, uniquement 44 % des résultats pour les bactéries ont été considérés valides avec l'appareil d'Andersen et 54 % pour les moisissures avec les filtres. Pour qu'un résultat soit considéré valide il devait respecter deux critères. Les deux valeurs ne devaient pas être zéro et devaient être incluses à l'intérieur de la limite de détection. Ce chercheur avait aussi relevé une perte de viabilité pour les bactéries Gram-négatives plus sensibles à la déshydratation. Il a également vérifié l'influence d'une période d'entreposage avant le traitement des échantillons. D'après ses résultats, une attente de 38 heures n'avait que peu d'influence sur les concentrations retrouvées. Une étude faite par Jensen²⁰ avec des filtres d'esters de cellulose et des cassettes ouvertes confirme les résultats de Thorne¹⁹. La méthode de Jensen ne proposait toutefois pas d'extractions et de dilutions ce qui entraînerait encore une fois pour les endroits à fortes concentrations des problèmes de saturation et de dénombrement. Lundholm, a comparé les filtres de gélatine aux filtres de type membrane et les a trouvés moins efficaces¹⁸. Un chercheur finlandais conclut que la méthode sur filtre était meilleure que les appareils d'Andersen pour les endroits à concentrations élevées²².

Pour remédier aux différents problèmes reliés aux méthodes précédentes, la méthode de prélèvement sur filtre de polycarbonate décrite par Palmgren et coll.²³ a été adaptée par les laboratoires de l'Institut de Recherche en Santé et Sécurité au Travail. Cette méthode permet des temps de prélèvement plus longs qu'avec les impacteurs de marque Andersen ce qui réduit les erreurs de concentrations reliées au volume de prélèvement. De plus, elle permet d'effectuer des dilutions des microorganismes prélevés et ainsi d'obtenir une quantité de colonies facilement dénombrables sur le milieu de culture. Comme les problèmes de saturation sont réduits, les manipulations reliées à l'identification sont elles aussi facilitées.

Lors de notre étude, les filtres de polycarbonate ont été utilisés et une extraction des microorganismes prélevés sur le filtre a été effectuée à l'aide d'une solution contenant un surfactant.

Les objectifs de cette recherche étaient de:

- comparer les résultats obtenus avec cette méthode et ceux obtenus avec la méthode standard de l'IRSST soit celle utilisant les impacteurs de marque Andersen;
- vérifier l'efficacité de captation des cassettes fermées comparativement aux cassettes ouvertes;
- d'évaluer l'effet de différents temps de prélèvement en rapport avec les problèmes de déshydratation;
- d'évaluer deux techniques d'extraction et leur efficacité respective.

2. Matériel et méthodes

2.1. Sites de prélèvement

L'étude a été effectuée en parallèle avec d'autres études réalisées par le programme soutien analytique dans des environnements de travail à hautes concentrations de microorganismes soit une porcherie et une ferme laitière.

2.2. Méthodes de prélèvement

Les filtres utilisés étaient en polycarbonate de 37 mm avec une porosité de 0,8 micron (Porotics Corporation, Livermore, CA). Les cassettes en matière plastique étaient constituées de trois sections, d'un support de cellulose et d'une membrane filtrante. Les cassettes étaient scellées avec une bande de cellulose lors des prélèvements avec cassette fermée. Les cassettes étaient reliées à des pompes à haut débit dont le débit était maintenu constant (Gilian Instrument Corp., Wayne, N.J.). Les débits des pompes étaient ajustés à 2 litres/minute et les temps d'échantillonnage variaient entre 15 et 60 minutes. Les débits étaient mesurés avec un débitmètre de masse à fil chauffant de marque Kurz (Kurz Instrument Inc. Carmel Valley, CA).

2.3. Méthodes d'analyses

Après l'échantillonnage, les prélèvements étaient ensuite acheminés au laboratoire en minimisant le brassage. Au laboratoire, 5 ml d'une solution d'eau peptonée stérile (Becton Dickinson Microbiology System, Cockeysville, MD) contenant une solution de surfactant de 0,05% tween 20 (polyoxyéthylènesorbitan monolaurate), (Sigma Chemical CO, St-Louis, MO) était incorporée dans chacune des cassettes pour faire l'extraction des cellules bactériennes ou fongiques. Les cassettes ainsi préparées étaient brassées pour une période de 15 minutes sur un mélangeur (Fisher Scientific Limited., Ottawa, ON). Par la suite, des dilutions de la solution d'extraction étaient effectuées (1:10, 1:100, 1:1000). Des étalements de surface de 0,1 ml de ces dilutions ainsi que de la solution d'extraction étaient effectués sur les milieux de culture nécessaires selon les microorganismes à dénombrer. Le SDA (Sabouraud dextrose agar, Quélab Laboratories, Montréal, QC) était utilisé pour les moisissures en général et le TSA (trypticase soya agar, Quélab Laboratories, Montréal, QC) était utilisé pour les bactéries en général. La température d'incubation pour les moisissures était de 25°C pour une période de 7 jours et de

37°C pour les bactéries pour une période de 48 heures. Les dénombrements étaient faits à l'aide d'un stéréomicroscope SMZ-2T (Nikon Inc., New-York) avec une lumière transmise pour les bactéries et une fibre optique pour les moisissures. Chaque colonie présente était marquée avec un crayon indélébile pour éviter de compter la même colonie à plusieurs reprises. La concentration finale était calculée en tenant compte du temps d'échantillonnage, du débit de prélèvement, du volume de la solution d'extraction utilisée, de la dilution effectuée et du volume étalé sur le pétri.

L'impacteur de marque Andersen était utilisé dans sa version à six étages avec le cône de collection pour les bactéries et la version N-6 également avec le cône pour les moisissures. Le débit de l'appareil était ajusté à 28 Lpm (litres par minute) à l'aide d'un débitmètre de masse à fil chauffant de marque Kurz (Kurz Instrument Inc., Carmel Valley, CA). Les temps de prélèvement utilisés dépendaient du lieu où ceux-ci étaient effectués. Pour les bactéries, des temps de 15 secondes et de 30 secondes étaient utilisés afin de minimiser les problèmes de saturation du milieu. Pour les moisissures, les temps de prélèvement étaient de 1 minute. Les milieux de culture et les températures d'incubation étaient les mêmes que pour la méthode sur filtre.

2.4. Méthode de comparaison des résultats obtenus avec les deux méthodes

Bien que Chatigny¹⁷ ne recommande pas la comparaison d'échantillonneurs de types de captation différents, la comparaison a tout de même été effectuée pour appuyer le développement de cette méthode pour les laboratoires de l'IRSST. Il est prévisible que des concentrations supérieures soient obtenues avec la méthode sur filtre à cause du bris des agrégats de particules lors des manipulations au laboratoire.

Pour comparer la méthode sur filtre et l'impacteur de marque Andersen, les prélèvements étaient effectués simultanément et en parallèle. Lors d'une première intervention exploratoire, quatre prélèvements sur filtre et quatre avec les Andersen étaient réalisés. Suite aux résultats obtenus et afin de faciliter les analyses statistiques, une quinzaine de prélèvements en simultané étaient réalisés sur les filtres et ce en parallèle avec une dizaine de prélèvements consécutifs avec les impacteurs de marque Andersen. Une troisième étape visait à évaluer une nouvelle méthode d'extraction. Pour ce, cinq prélèvements étaient suffisants pour vérifier statistiquement une différence entre les deux méthodes d'extraction. Des tests de comparaison statistique standard ont été utilisés pour comparer les résultats. Le logiciel Statgraphique version 6.0 a été utilisé pour

tous les tests statistiques. Dû à la distribution de fréquence normale des résultats, le test de T de Student a été choisi pour effectuer la comparaison des concentrations moyennes de microorganismes, une probabilité supérieure à 0,05 indiquant qu'il n'y a pas de différences significatives entre les moyennes comparées.

2.5. Dilution et extraction

Selon les lieux et les temps de prélèvement utilisés, différentes dilutions ont été réalisées. Des dilutions de 10, 100 et 1000 ont été effectuées. Le but était d'obtenir des pétris contenant entre 30 et 300 colonies lors du dénombrement. Ces nombres sont recommandés pour cette technique, parce qu'ils facilitent le dénombrement et limitent l'inhibition de croissance provoquée par des métabolites secondaires produits par d'autres colonies. L'étalement de chaque dilution a été effectué en triplicata comme le recommande la méthode.

Deux méthodes d'extraction ont été vérifiées. La première méthode décrite par Palmgren²³ consiste à extraire les microorganismes du filtre en ajoutant 5 ml d'eau peptonée stérile additionnée d'une solution de 0,05 % tween 20 directement dans la cassette et en agitant durant 15 minutes. La seconde méthode, qui est une adaptation de la première, consiste à retirer le filtre de la cassette et à le placer de façon aseptique dans une petite bouteille stérile contenant 5 ml d'eau peptonée stérile additionnée de 0,05 % tween 20, le tout étant aussi agité durant 15 minutes.

3. Résultats et discussion

3.1 Comparaison des techniques de prélèvement: filtres de polycarbonate et impacteurs de marque Andersen

Les résultats des trois (3) séries de prélèvements de bactéries effectués pour comparer les filtres de polycarbonate et les impacteurs Andersen à 6 étages se retrouvent au tableau I. Les concentrations moyennes de bactéries ont été comparées avec le test de T de Student après avoir vérifié que la distribution de fréquence était normale. Le coefficient de variation de chaque méthode a été calculé pour chaque journée d'échantillonnage.

Tableau I: Comparaison des concentrations moyennes de bactéries obtenues avec les deux méthodes de prélèvement

Échantillonnage	Appareils	Effectif n	Concentration UFC*/m ³ d'air	Écart-type UFC*/m ³ d'air	C.V. %	Probabilité
1	Impacteur Andersen	3	119 420	22 550	23%	p ≤ 0,05
	Filtre	3	314 820	76 390	24%	
2	Impacteur Andersen	10	60 890	18 510	30%	p ≤ 0,05
	Filtre	14	136 930	32 720	24%	
3	Impacteur Andersen	4	41 210	2 650	6%	p ≥ 0,05
	Filtre	5	43 600	3 210	7%	

* Unité formatrice de colonie

Les résultats du tableau I démontrent que les concentrations moyennes de bactéries obtenues à l'aide de la méthode sur filtre étaient supérieures ou équivalentes aux concentrations moyennes de bactéries obtenues avec les impacteurs. Dans l'étude de Thorne¹⁹, les concentrations moyennes de bactéries obtenues étaient de l'ordre de $7,5 \times 10^4$ UFC/m³ d'air et n'étaient pas significativement différentes entre les deux méthodes. Il faut toutefois signaler que Thorne utilisait l'impacteur de marque Andersen dans la configuration à 2 pétris pour les bactéries¹⁹. Dans notre étude, les concentrations moyennes de bactéries étaient plus élevées de façon

statistiquement significative avec les filtres qu'avec les impacteurs lorsque les concentrations étaient supérieures à 1×10^5 UFC/m³ d'air. Par contre, lorsque les concentrations obtenues étaient inférieures, soit de l'ordre de 5×10^4 UFC/m³ d'air, il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les concentrations des deux méthodes. Les impacteurs de marque Andersen sont donc efficaces à certains niveaux de contamination comme l'ont démontré également les résultats de Thorne¹⁹.

Les coefficients de variation calculés pour les deux méthodes sont comparables. Les manipulations en laboratoire n'augmentent pas l'imprécision de la méthode sur filtre à un niveau supérieur à celui obtenu avec les impacteurs de marque Andersen. D'après ces résultats, la méthode sur filtre serait une bonne alternative aux prélèvements faits avec les impacteurs Andersen puisqu'elle peut être utilisée pour des concentrations de bactéries supérieures à 10^5 UFC/m³ d'air. De plus, cette méthode réduit le temps nécessaire au dénombrement, bien que les manipulations au laboratoire soient plus importantes.

Le tableau II présente les résultats des concentrations moyennes de moisissures obtenues sur filtre de polycarbonate et celles obtenues avec l'impacteur de marque Andersen N-6. Une seule série de prélèvement a été effectuée puisque les concentrations rencontrées étaient relativement peu élevées dans les milieux étudiés. Les concentrations se rapprochaient de la limite de détection de la méthode qui est d'environ 1250 UFC/m³ d'air pour 20 minutes d'échantillonnage à 2Lpm.

Tableau II: Comparaison des concentrations moyennes de moisissures obtenues à l'aide des deux méthodes de prélèvement

Appareil	Effectif n	Concentration moyenne UFC/m ³ d'air	Écart-type UFC/m ³ d'air	C.V. %	Probabilité
Impacteur	13	2520	1730	69%	p ≥ 0,05
Filtre	14	2740	962	35%	

Au niveau des moisissures, les concentrations moyennes n'étaient pas statistiquement différentes entre les deux méthodes de prélèvement. Les impacteurs semblent efficaces pour de telles concentrations de moisissures, comme il a été démontré aussi pour les bactéries. Il faut remarquer par contre que le coefficient de variation est élevé. Toutefois, dans l'étude de Thorne¹⁹ les moyennes de concentrations de moisissures obtenues avec les appareils Andersen

étaient 3 fois moins élevées que celles obtenues avec la méthode des filtres, soit 1 900 comparativement à 5 850 UFC/m³ d'air. Ce chercheur n'avait pas pu expliquer cette faiblesse de l'impacteur de marque Andersen dans son étude ¹⁹.

Le coefficient de variation obtenu pour les prélèvements effectués avec les appareils d'Andersen est beaucoup plus élevé que celui obtenu avec la méthode sur filtre de polycarbonate, soit 69% comparativement à 35%. Cette augmentation du coefficient de variation peut être imputée à la difficulté du dénombrement des moisissures au laboratoire lorsque les concentrations sont plus élevées. Les colonies de moisissures sont beaucoup plus volumineuses que les colonies de bactéries. Bien qu'une attention spéciale soit portée afin de dénombrer toutes les colonies présentes, il est possible qu'une colonie de gros diamètre cache des colonies de diamètres inférieurs, qui ne peuvent ainsi être dénombrées. Ceci peut diminuer la précision de la méthode générale pour les impacteurs.

3.2 Méthode sur filtre : Comparaison de l'utilisation des cassettes fermées vs ouvertes

Dans un deuxième temps, l'utilisation des cassettes ouvertes comparativement aux cassettes fermées a été étudiée afin de vérifier si elle augmentait l'efficacité de collection des particules microbiologiques. Les résultats de ce test pour les bactéries et les moisissures se retrouvent au tableau III.

Tableau III: Comparaison des concentrations moyennes de microorganismes obtenues avec les cassettes ouvertes et fermées

Microorganismes	Cassettes	Effectif n	Concentrations UFC/m ³ d'air	Écart-type UFC/m ³ d'air	C.V. %	Probabilité
Bactéries	Ouvertes	13	180190	54370	30%	p ≤ 0,05
	Fermées	14	136930	32720	24%	
Moisissures	Ouvertes	13	3810	1260	33%	p ≤ 0,05
	Fermées	14	2740	960	35%	

Les résultats du tableau III démontrent que les concentrations moyennes de bactéries et de moisissures étaient significativement plus élevées lorsque les prélèvements étaient effectués à l'aide de cassettes ouvertes comparativement à l'utilisation des cassettes fermées. L'efficacité de collection des cassettes ouvertes a été donc supérieure à celle des cassettes fermées dans cette

étude. Ces résultats sont appuyés par plusieurs recherches effectuées dans le domaine des aérosols et qui ont rapporté des résultats similaires²⁴⁻²⁵. L'utilisation des cassettes ouvertes devrait donc être favorisée lors de l'échantillonnage des microorganismes. La manipulation de ces cassettes demande toutefois une plus grande attention. Il ne faut pas toucher l'intérieur de la cassette et les risques de projection sont plus importants.

3.3 Méthode sur filtre: Effet du temps d'attente avant l'extraction

Les bactéries sont sensibles à la déshydratation. Pour faciliter l'implantation de la méthode sur filtre au laboratoire, une vérification de l'effet d'une attente de 24 heures avant le traitement des échantillons a été testée pour les bactéries et les moisissures. Le tableau IV présente les résultats obtenus.

Tableau IV: Vérification du temps d'attente avant l'extraction sur les concentrations moyennes de bactéries et de moisissures

Microorganismes	Traitement	Effectif n	Concentration UFC/m ³ d'air	Écart-type UFC/m ³ d'air	C.V. %	Probabilité
Bactéries	jour même	14	136930	32720	24%	
	24 heures	13	134160	31970	24%	p ≥ 0,05
Moisissures	jour même	14	2740	960	35%	
	24 heures	12	3430	990	29%	p ≥ 0,05

Les résultats de ce test démontrent qu'il n'y avait pas de différence significative entre les concentrations moyennes entre une extraction immédiate et une extraction après une attente de 24 heures autant pour les bactéries que pour les moisissures. Ces résultats sont confirmés par les résultats de Thorne qui n'a pas trouvé de différence significative pour une attente pouvant atteindre 38 heures.

3.4 Méthode sur filtre: Vérification d'une méthode d'extraction en bouteille

Pour optimiser la quantité de cellules microbiennes récupérées à partir du filtre lors de l'extraction et l'étalement, une adaptation de la méthode de Palmgren a été testée. Au lieu de faire l'extraction directement dans la cassette, le filtre a été retiré et placé de façon aseptique dans une petite bouteille stérile contenant 5 ml de la solution d'extraction, le tout étant par la suite

brassé pour une période de 15 minutes. Le tableau V présente les résultats obtenus.

Tableau V: Comparaison de l'extraction en bouteille et de celle en cassette

Extraction	Effectif n	Concentration UFC/m ³ d'air	Écart-type UFC/m ³ d'air	C.V. %	Probabilité
Cassettes	5	44400	10500	24%	
Bouteilles	5	43600	3210	7%	p > 0,05

Les concentrations moyennes de bactéries n'étaient pas significativement différentes entre ces deux méthodes. Par contre, le coefficient de variation de cette nouvelle méthode était inférieur à celui obtenu avec l'extraction en cassettes décrite par Palmgren²³. L'extraction en bouteille permet probablement des extractions plus homogènes augmentant ainsi l'exactitude de la méthode. Pour obtenir des résultats les plus exacts possible, cette nouvelle méthode d'extraction sera favorisée.

3.5 Comparaison de différents temps de prélèvement

Plusieurs chercheurs ont remarqué une perte de viabilité des bactéries due à la déshydratation provoquée par la méthode sur filtre¹⁹⁻²⁰. Pour vérifier cette affirmation et observer si la perte de viabilité augmentait avec le temps de prélèvement, différentes durées de prélèvement ont été testées. Les résultats de ces tests sont présentés au tableau VII. Les tests ont été effectués sur trois temps différents soit 20 minutes, 40 minutes et 60 minutes.

Tableau VI: Comparaison des concentrations moyennes pour différents temps de prélèvement

Temps minutes	Effectif n	Concentration UFC/m ³ d'air	Écart-type UFC/m ³ d'air	C.V. %	Probabilité
20	5	43600	3210	7%	a*
40	5	22900	5480	24%	b p ≤ 0,01
60	5	26040	12710	49%	b p ≤ 0,01

a* différent significativement de b

Les résultats obtenus de ces tests démontrent qu'il y a eu une diminution significative des concentrations entre un prélèvement de 20 minutes et 40 minutes. Toutefois, un plateau semble être atteint entre les prélèvements de 40 minutes et 60 minutes puisqu'il n'y avait pas de différence significative entre ces deux temps. Il y aurait une certaine quantité de bactéries qui ne supporterait pas la déshydratation causée par une période de prélèvement plus longue. Les bactéries les plus sensibles à la déshydratation semblent mourir tandis que les autres moins sensibles peuvent résister plus longtemps.

Conclusion

Les résultats obtenus pour chacun des différents tests effectués démontrent que la méthode sur filtre est équivalente à celle de l'impacteur de marque Andersen. Elle est en plus mieux adaptée pour faire des prélèvements dans les milieux où les concentrations de microorganismes sont élevées. Les cassettes ouvertes devraient être utilisées et les temps de prélèvement pour les bactéries ne devraient pas excéder 20 minutes. L'acheminement au laboratoire devrait être le plus rapide possible pour que le traitement des échantillons soit effectué dans un délai raisonnable. Si la méthode d'extraction en bouteille est utilisée, le coefficient de variation de la méthode sur filtre sera inférieur à celui de la méthode avec les impacteurs de marque Andersen. Toutefois, la limite de détection de cette méthode est de 1250 UFC/m³ d'air pour un prélèvement de 20 minutes à 2 Lpm, ce qui est relativement élevée. La méthode sur filtre est peu coûteuse et simple d'utilisation sur le terrain.

Cette étude a permis de mettre au point une nouvelle méthode de prélèvement qui est utilisable pour les endroits où les concentrations de microorganismes sont élevées.

D'autres membranes filtrantes devraient être testées afin de vérifier si elle peuvent permettre une augmentation de l'efficacité de la méthode. De plus, il serait intéressant de tester cette méthode avec des cyclones afin de pouvoir séparer la fraction respirable de la fraction non respirable.

Bibliographie

1. Fraser, D.W., Legionellosis: Evidence of Airborne Transmission. *Ann. N.Y. Acad. Sciences*, 1980, 61-66.
2. Imperado, P.J., Legionellosis and the Indoor Environment. *Bull. N. Y. Acad. Med*, 1981, 10:922-935.
3. Benenson, A.S., *Control of Communicable Disease in Man*. Fourteenth edition, Washington, U.S.A., 1985. pp.485.
4. Health and Safety Executive, Legionnaires'Disease. Guidance note EH 48, 1987
5. Lundholm, M., et P., Rylander, Occupational Symptoms among Compost Workers. *J. Occ. Health*, 1980, 22: 256-257.
6. Rylander, R., Lung Diseases caused by organic dust in the Farm Environment. *Am. J. Ind. Med.*, 19886, 10:221-227.
7. Burrell, R., et S.H. Ye, Toxic Risks from Inhalation of Bacterial Endotoxin. *Br. J. Ind. Med.* 1990, 47:688-691.
8. Laitinen, S. Nevalainen, A., Kotimaa, M., Liesivuori, J., et P. Martikainen, Relationship between Bacterial Counts and Endotoxin Concentrations in the Air of Wastewater Treatment Plants. *App. Env. Micro.*, 1992, 11:3774-3776.
9. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, *Guidelines for the Assessment of Bioaerosols in the Indoor Environment*. Cincinnati, OH, 1989.
10. Olenchock, S.A., Mentnech, M.S., Mull, J.C., Gladdish, M.S., Green, F.H.Y. et P.C. Major, Complement, Polymorphonuclear Leukocytes and Platelets in acute experimental Respiratory Reactions to *Aspergillus*. *Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Dis.*, 1979, 2: 113-124.

11. Kramer, M.N. Kurup, V.P., et J.N. Fink., Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis from a Contaminated Dump Site. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1989, 140: 1086-1088.
12. Gillett, J.W., Issues in Risk Assessment of Compost from Municipal Solid Waste: Occupational Health and Safety, Public Health, and Environmental Concerns. *Biomass and Bioenergy*, 1992, 3: 145-162.
13. Donham, K.J., Potential Health Hazard to Agricultural Workers in Swine Confinement Buildings. *J. Occ. Med.*, 1977, vol 19, 6:383-387
14. Donham, K.J., Environmental and Health Studies in Swine Confinement Buildings. *Br. J. Ind. Med.*, 1989, 46:31-37.
15. Clark, C.S., Health Effects Associated with Wastewater Treatment and Disposal. *Journal WPCF*, 1984, vol 56, 6:625-627.
16. Morey, P., Air sampling equipment in: Assessing Bioaerosols in Indoor Environments. Sponsored by the University of Michigan and the ACGIH, oct 88.
17. Chatigny, M., Macher, J.M., Burge, H.A. and Solomon, W.R. Sampling Airborne Microorganisms and Aeroallergens in "Air sampling instruments". 7th edition, 1989, p 199--218.
18. Lundholm, M., Comparison of Methods for Quantitative Determinations of Airborne Bacteria and Evaluation of Total Viable Counts. *App. Env. Micro.*, 1982, 1: 179-183.
19. Thorne, P.S., Kiekhaefer, M.S., Whitten, P. et K.J. Donham, Comparison of Bioaerosol Sampling Methods in Barns Housing Swine. *App. Env. Micro.*, 1992, 8: 2543-2551.
20. Jensen, P.A., Todd, W.F., Davis, G.N. et P.V. Scarpino, Evaluation of Eight Bioaerosol Samplers Challenged with Aerosols of free Bacteria. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1992, 10: 660-667.

21. Wolochow, H., The Membrane Filter Technique for Estimating Numbers of viable Bacteria: some observed Limitations with certain Species. *Appl. Microbiol.*, 1958, 6:201-206.
22. Rahkonen, P., Airborne Contaminants at Waste Treatment Plants. *Waste management and research*. 1992, 10:411-421.
23. Palmgren, U., Strom, G., Blomquist, G., Malmberg, P., Collection of Airborne Microorganisms on Nucleopore Filters, Estimation and Analysis - CAMNEA Method. *J. Applied Bacteriology*. 1986, 61: 401-406.
24. Bowman, J.D. et J.P. Smith, Performance Expectations for Dust Sampling. National Ints. for Occupational Safety and Health, Cincinnati, OH. 1980.
25. Beaulieu, H.J., Fidino, A.V., Arlington, K.L.B., et R.M. Buchan, A Comparison of Aerosol Sampling Techniques: "Open" Versus "Closed-face" Filter Cassettes. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1980, 10:758-765.