

## Données de validation

### Données de validation principales

#### Généralités

**Substance** \_\_\_\_\_ microorganismes aérobies

**Dispositif de prélèvement :**

#### Informations complémentaires

### Annexe 1 Le choix des milieux de culture et des conditions d'incubation

Le milieu de culture et les conditions d'incubations (température, durée, et éventuellement hygrométrie) sont des paramètres essentiels qui sélectionnent le type de microorganismes qui vont pouvoir se développer sur le milieu. Ces paramètres déterminent les groupes microbiens susceptibles d'être pris en compte dans le comptage et doivent être standardisés.

Les milieux de culture

La composition des milieux de cultures et les propriétés physicochimiques associées (pH,  $a_w$ , salinité etc.) sélectionnent les microorganismes selon leurs exigences métaboliques et physiologiques. Les milieux dits « non sélectifs » sont des milieux à spectre large qui contiennent les éléments nutritifs et les conditions physico-chimiques favorables à la croissance de la plupart des germes cultivables recherchés. Pour autant, ces milieux ne peuvent satisfaire aux exigences nutritionnelles de tous les microorganismes. Les milieux dits « sélectifs » sont des milieux dont la composition (éléments nutritifs, minéraux etc...) est favorable à un groupe microbien donné. Le caractère sélectif peut également être conféré par un agent chimique antimicrobien (antibiotique) ou par l'ajustement du pH à une valeur extrême. Pour la mesure des expositions professionnelles aux bioaérosols, les milieux les plus utilisés sont les suivants :

#### Milieux pour les bactéries

Le milieu Tryptone Caséine Soja (TSA) est un milieu d'utilisation générale, contenant deux qualités de peptone permettant le développement d'une grande variété de germes (Tableau 1). Il convient aussi bien aux aérobies qu'aux anaérobies, ces derniers se développant en culture profonde ou en atmosphère anaérobie. Pour l'examen d'échantillons prélevés en conditions réelle d'exposition, le milieu TSA peut être complété d'un antibiotique, par exemple, l'actidione (ou cycloheximide), qui inhibe la croissance des champignons saprophytes mais pas celle des pathogènes. L'actidione est ajouté aux milieux de culture lors de sa préparation afin de privilégier la croissance des bactéries.

#### Milieux pour les moisissures

Le milieu MEA (Malt Extract Agar) est un milieu utilisé pour la recherche, l'isolement et la numération des levures et moisissures (Tableau 1). Au laboratoire, il est préparé à partir de formule complète déshydratée.

	Milieux		
	TSA	TSA+act	MEA
<b>Composition en g/L</b>	Tryptone : 15,0 Peptone de soja : 5,0 Chlorure de sodium : 5,0 Agar : 15,0	Milieu TSA amendé d'actidione à 0,08 g/L.	Extrait de malt : 30,0 Peptone mycologique : 5,0 Agar : 15,0
<b>pH</b>	7,3	7,3	5,4

**Tableau 1 :** Composition des principaux milieux de culture utilisés pour le dénombrement de microorganismes cultivables dans l'air.

Les conditions d'incubation

Microorganismes thermophiles et mésophiles.

Groupe microbiens	Milieu de culture	Antibiotiques	Température d'incubation	Durée d'incubation
Bactéries mésophiles	TSA+act	Actidione 0,08 g/L	25°C	3 jours
Bactéries thermophiles	TSA	-	56°C	3 jours
Moisissures thermophiles	MEA	-	47°C	3 jours
Moisissures mésophiles	MEA	-	25°C	3-5 jours

**Tableau 2 :** Milieux et conditions de culture pour le dénombrement des microorganismes cultivables dans les échantillons d'air.

## ANNEXE 2 Éléments de validation de méthode

Le calcul de la répétabilité de la méthode de dénombrement des microorganismes cultivables indique un CV de l'ordre de 17 % pour les moisissures et de 13 % pour les bactéries.

### Estimation de l'intervalle de confiance sur la concentration en microorganismes cultivables dans la prise d'essai de l'échantillon [7]

Pour estimer la validité du résultat et éviter des interprétations trop strictes, il est utile de déterminer l'intervalle de confiance caractérisant la répartition statistique des microorganismes dans l'échantillon.

Avec une probabilité de 95 %, l'intervalle de confiance IC, caractérisant la dispersion microbienne dans l'échantillon, est calculé de la manière suivante :

$$IC = \left[ N_p + \frac{192}{v \times (n_1 + 0,1 \times n_2) \times d} \pm \frac{196 \times \sqrt{C}}{v \times (n_1 + 0,1 \times n_2) \times d} \right]$$

Avec :

$N_p$  : concentration en microorganismes cultivables dans la prise d'essai de l'échantillon en UFC/mL

$C$  : nombre d'UFC observées sur l'ensemble des boîtes sélectionnées et exploitables (boîtes provenant de deux dilutions successives et dont au moins une contient 15 colonies ; seules les boîtes correspondant à un nombre d'UFC inférieur ou égal à 300 sont considérées dans le calcul)

$v$  : volume de la suspension étalée à la surface des milieux en mL (par exemple 0,1 mL).

$n_1$  : nombre de boîtes retenues à la première dilution (la plus faible).

$n_2$  : nombre de boîtes retenues à la seconde dilution (la plus forte)

$d$  : taux de dilution correspondant à la dilution la plus faible retenue ( $d = 1$  pour l'échantillon non dilué ;  $d = 0,01$  pour la dilution au 1/100<sup>ème</sup> etc...).

[Retour sur l'exemple chiffré N°1 :](#)

Dilution	Boîtes de Pétri	Résultats de Comptage	Boîtes retenues	n1	n2	d	C	N <sub>p</sub>	Résultat arrondi (UFC/ml)
1/10	Boite n°1	>300		2	2	1/100	362	164545	1,65 × 10 <sup>5</sup>
1/10	Boite n°2	>300							
1/100	Boite n°1	119	x						
1/100	Boite n°2	212	x						
1/1000	Boite n°1	15	x						
1/1000	Boite n°2	16	x						

Avec N<sub>p</sub> = 1,65 × 10<sup>5</sup> UFC/ml pour 362 colonies comptées, l'intervalle de confiance IC est le suivant :

$$IC = 164545 \pm \frac{1,92}{0,1 \times (2 + 0,1 \times 2) \times 0,01} \pm \frac{1,96 \times \sqrt{362}}{0,1 \times (2 + 0,1 \times 2) \times 0,01}$$

Pour cet exemple, les limites de l'intervalle de confiance sont donc

$$IC_1 = 148467 \text{ UFC/ml et } IC_2 = 182368 \text{ UFC/ml}$$

Si ces résultats sont arrondis à deux chiffres significatifs après la virgule, l'intervalle de confiance à 95 % sur le résultat N<sub>p</sub> = 1,65 × 10<sup>5</sup> UFC/ml est compris entre 1,48 × 10<sup>5</sup> UFC/ml et 1,82 × 10<sup>5</sup> UFC/ml.

Les limites de l'intervalle de confiance, exprimées en pourcentage et calculées sur les données non arrondies, sont comprises entre - 9,8 % et 10,8 %.

[Retour sur l'exemple chiffré N°2 :](#)

Dilution	Boîtes de Pétri	Résultats de Comptage	Boîtes retenues	n1	n2	d	C	N <sub>p</sub>	Résultat arrondi (UFC/ml)
1	Boite n°1	>300		2	2	1/10	202	9181,82	9,18 × 10 <sup>3</sup>
1	Boite n°2	>300							
1/10	Boite n°1	88	x						
1/10	Boite n°2	99	x						
1/100	Boite n°1	5	x						
1/100	Boite n°2	10	x						

Avec N<sub>p</sub> = 9,18 × 10<sup>3</sup> UFC/ml pour 202 colonies comptées, l'intervalle de confiance IC est le suivant :

$$IC = 9181,82 \pm \frac{1,92}{0,1 \times (2 + 0,1 \times 2) \times 0,1} \pm \frac{1,96 \times \sqrt{202}}{0,1 \times (2 + 0,1 \times 2) \times 0,1}$$

Pour cet exemple, les limites de l'intervalle de confiance sont donc

$$IC_1 = 8002,87 \text{ UFC/ml et } IC_2 = 10535,3 \text{ UFC/ml}$$

Si ces résultats sont arrondis à deux chiffres significatifs après la virgule, l'intervalle de confiance à 95 % sur le résultat N<sub>p</sub> = 9,18 × 10<sup>3</sup> UFC/ml est compris entre 8,00 × 10<sup>3</sup> UFC/ml et 1,05 × 10<sup>4</sup> UFC/ml.

Les limites de l'intervalle de confiance, exprimées en pourcentage et calculées sur les données non arrondies, sont comprises entre - 12,8 % et 14,7 %.

Enfin, d'autres variations dues à la méthode d'analyse interviennent, en particulier celles liées aux erreurs de dilution, dont l'importance varie d'un laboratoire à l'autre et qui devront être appréciées au cas par cas.