

PROTOCOLE POUR LA VALIDATION ET LA VÉRIFICATION D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE EN MICROBIOLOGIE (DR-12-VMM)

Mise à jour : 23 août 2023

Coordination et rédaction

Cette publication a été réalisée par la Direction générale de la coordination scientifique et du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (DGCSCEAEQ) du ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs (MELCCFP). Elle a été produite par la Direction des communications du MELCCFP.

Renseignements

Téléphone : 418 521-3830

1 800 561-1616 (sans frais)

Formulaire : www.environnement.gouv.qc.ca/formulaires/renseignements.asp

Internet : www.environnement.gouv.qc.ca

Dépôt légal – 2023

Bibliothèque et Archives nationales du Québec

ISBN 978-2-550-95611-2 (PDF)

Tous droits réservés pour tous les pays.

© Gouvernement du Québec – 2023

Table des matières

Table des matières	iii
Avant-propos	iv
Glossaire	1
1. Introduction	2
2. Limite de détection d'une méthode	2
3. Limites de quantification d'une méthode	2
4. Fidélité	3
4.1 Réplicabilité	3
4.2 Répétabilité	3
4.3 Reproductibilité	3
4.4 Méthode de calcul de la réplicabilité, la répétabilité et la reproductibilité	4
5. Pourcentage de récupération	4
5.1 Méthode de calcul du pourcentage de récupération	4
6. Performance de la méthode	5
6.1 Méthode de calcul de la performance	5
7. Sélectivité de la méthode	6
7.1 Méthode de calcul de la sélectivité	6
Références	7
Annexe I	8
Annexe II	9
Annexe III	10
Annexe IV	11

Avant-propos

Le *Protocole pour la validation et la vérification d'une méthode d'analyse en microbiologie* (DR 12 VMM) s'inscrit dans la série de documents de référence produits par la Direction générale de la coordination scientifique et du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (DGCSCEAEQ), direction générale responsable de la gestion du Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse (PALA) pour le ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs. Le protocole précise les exigences liées à la validation des méthodes d'analyse en microbiologie lors de l'implantation de nouvelles méthodes normalisées au laboratoire et du suivi des méthodes qui sont déjà utilisées.

Ce document est réservé aux méthodes quantitatives uniquement. La vérification des méthodes présence/absence se fait par les contrôles réguliers de la méthode.

Glossaire

Colonie atypique : colonie qui ne présente pas la morphologie coloniale attendue (aspect et couleur) sur le milieu de culture employé.

Colonie typique : colonie qui présente la morphologie coloniale attendue (aspect et couleur) sur le milieu de culture employé.

Comptage confirmé : comptage obtenu après avoir soumis les colonies présumées à d'autres tests.

Comptage présumé : nombre de colonies qui, selon leur morphologie coloniale attendue (aspect et couleur), correspondent à l'organisme cible.

Duplicata : deux parties aliquotes distinctes obtenues à partir d'un même échantillon et soumises à toutes les étapes de la procédure analytique.

Échantillon fortifié : échantillon réel auquel on a ajouté une quantité connue d'un ou de plusieurs organismes cibles. La quantité ajoutée doit se situer dans les limites de quantification de la méthode.

Échantillon réel : échantillon prélevé directement dans l'environnement (p. ex., eau du robinet, eau de surface, eaux usées).

Réplicat : plusieurs parties aliquotes distinctes obtenues à partir d'un même échantillon et soumises aux mêmes procédures analytiques du prétraitement au dosage.

1. Introduction

Le présent document définit le processus et les termes relatifs à la fiabilité et à la validation secondaire d'une méthode d'analyse en microbiologie lors de son implantation et à la vérification de la performance d'une méthode déjà en utilisation au laboratoire.

La validation initiale (primaire) d'une méthode d'analyse entraîne la détermination de plusieurs paramètres : la limite de détection d'une méthode, les limites de quantification d'une méthode, la fidélité (réplicabilité, répétabilité, reproductibilité), la performance, la sélectivité et la récupération. Elle est généralement effectuée par l'organisme qui a mis au point cette méthode.

La validation secondaire est effectuée lors de l'implantation d'une méthode de référence normalisée – par la DGCSCEAEQ, le ministère de l'Environnement de l'Ontario, l'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (USEPA), Santé Canada, l'Organisation internationale de normalisation (ISO), l'Association française de normalisation (AFNOR), etc. – pour vérifier la capacité du laboratoire à obtenir une performance comparable aux données de validation publiées. Elle permet d'établir si la nouvelle méthode est équivalente ou supérieure à la méthode usuelle du laboratoire. Les données de validation permettent ensuite d'effectuer le suivi de la performance de la méthode en cours d'utilisation, de détecter des tendances et des problèmes potentiels sur le plan analytique, d'évaluer la performance des analystes et de déterminer l'incertitude de mesure des méthodes.

Il existe plusieurs définitions et de nombreuses façons de calculer les différents paramètres liés à la validation d'une méthode. Il devient essentiel d'uniformiser ces définitions ainsi que les méthodes de calcul utilisées pour déterminer la conformité du laboratoire aux exigences du présent protocole.

L'annexe I illustre les formules de calcul qui sont utilisées pour la détermination des paramètres de validation secondaire.

2. Limite de détection d'une méthode

La limite de détection d'une méthode (LDM) permet de déceler la concentration minimale, à l'aide d'une méthode d'analyse, avec une fiabilité définie. Théoriquement, pour une méthode en microbiologie, il s'agit d'un organisme cible dans le volume d'échantillon analysé. La limite de détection est normalement définie dans la méthode de référence normalisée

3. Limites de quantification d'une méthode

Les limites de quantification d'une méthode (LQM) sont les concentrations la plus basse et la plus élevée qui constituent la zone quantifiable d'une méthode. Ces concentrations correspondent au nombre de colonies isolées d'un volume donné d'échantillon qui peuvent être dénombrées sur une seule membrane ou gélose, à l'aide d'une méthode d'analyse, avec une fiabilité définie. Les limites de quantification sont définies dans les méthodes de référence normalisées.

La limite supérieure de quantification est la valeur au-delà de laquelle la fiabilité d'un dénombrement sur une seule membrane ou gélose à l'aide d'un volume déterminé d'échantillon est affectée par des facteurs incontrôlables.

La limite inférieure de quantification est la valeur en deçà de laquelle l'erreur anticipée devient trop grande par rapport au nombre de colonies dénombrées.

4. Fidélité

La fidélité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises (**$n = 10$ réplicats**) dans des conditions déterminées. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de répliquabilité, de répétabilité ou de reproductibilité pour une méthode.

4.1 Répliquabilité

La répliquabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenus pour le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dans les mêmes conditions : même analyste, mêmes entonnoirs (filtration), même lot de milieu de culture, même lot de membranes filtrantes, même incubateur, même jour d'analyse. La répliquabilité peut varier d'un analyste à un autre. Dans la littérature, l'expression « précision intra-technicien » est souvent employée. D'ailleurs, cette donnée peut servir ultérieurement à l'évaluation et au suivi de la performance technique d'un analyste.

Ce paramètre de validation est déterminé à partir de l'équation suivante :

$$\frac{t_{(0,975; n-1)} \times s_1}{\sqrt{n}}$$

où s_1 est l'écart type d'une série de mesures se référant à la répliquabilité.

4.2 Répétabilité

La répétabilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus pour le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dont les conditions analytiques varient, par exemple l'analyste, le lot de préparation de milieu de culture, le lot d'eau de rinçage, le lot de membranes filtrantes, l'incubateur, le moment de la journée (matinée et après-midi), le poste de travail, etc., varient.

Ce paramètre de validation est déterminé à partir de l'équation suivante :

$$\frac{t_{(0,975; n-1)} \times s_2}{\sqrt{n}}$$

où s_2 est l'écart type d'une série de mesures se référant à la répétabilité.

4.3 Reproductibilité

La reproductibilité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus pour le même échantillon soumis à l'essai dans des laboratoires différents et dans les conditions suivantes : analyste différent, appareil différent, même jour.

Cette donnée n'est disponible que si le laboratoire participe à un essai inter-laboratoire pour une méthode identique et un même échantillon et n'est requise que pour la validation d'une méthode développée par le laboratoire. À l'intérieur du PALA, le critère de variation relatif (CVR) est un excellent indicateur de la reproductibilité d'une méthode.

4.4 Méthode de calcul de la réplicabilité, la répétabilité et la reproductibilité

Les trois termes précédents se rapportant à la fidélité s'expriment à l'aide d'un intervalle de confiance à une concentration donnée, en fonction de l'écart type $[S_{(n)}]$, à un niveau de confiance spécifié, habituellement 95 %, et pour un nombre donné de déterminations ($n = 10$ réplicats).

L'intervalle de confiance à 95 % sur la moyenne arithmétique d'une série de mesures est défini par :

$$\bar{x} \pm \frac{t_{(0,975; n-1)} \times S}{\sqrt{n}}$$

Il faut se référer à une table statistique de la distribution de Student pour connaître la valeur de $t_{(0,975; n-1)}$ correspondant à la probabilité au dépassement bilatéral (voir l'annexe II). Pour 10 réplicats, $t_{(0,975; n-1)} = 2,262$.

La réplicabilité, la répétabilité et la reproductibilité doivent être déterminées dans la zone quantifiable de la méthode. Il faut donc choisir une concentration d'un **échantillon réel ou fortifié** et faire **dix réplicats du même échantillon**. Chaque échantillon doit subir toutes les étapes de la méthode d'analyse **en respectant les conditions spécifiées à l'égard de la réplicabilité, la répétabilité et la reproductibilité**. Il faut ensuite faire l'ensemble des calculs liés à la méthode et reporter les résultats en utilisant les unités appropriées et le nombre nécessaire de chiffres significatifs. Un test de rejet reconnu (Grubb, Dixon, etc.) doit être inclus dans les calculs si certaines données semblent aberrantes.

L'annexe IV présente des exemples d'approches pour le calcul de la réplicabilité et de la répétabilité.

5. Pourcentage de récupération

Le pourcentage de récupération permet de déterminer, pour un échantillon donné ou un type de matrice donné et à un niveau de concentration donné, la présence d'interférence potentielle lors du processus d'analyse.

Le taux de récupération correspond à la différence (en pourcentage) entre la concentration mesurée d'un échantillon fortifié et la concentration mesurée du même échantillon non fortifié, divisée par la concentration de l'organisme ajouté. Un minimum de cinq essais est exigé pour la détermination du pourcentage de récupération d'une méthode d'analyse

5.1 Méthode de calcul du pourcentage de récupération

Dans la zone quantifiable de la méthode, analyser **cinq échantillons réels**. L'eau stérile ou déminéralisée n'est pas considérée comme un échantillon réel, contrairement à l'eau prélevée à même le robinet.

Ajouter une concentration de l'organisme ciblé tout en évitant de se rendre au-delà de la limite supérieure de quantification de la méthode. La concentration de l'organisme ajoutée doit être déterminée par une autre méthode, telle l'incorporation à la gélose utilisant un milieu de culture non sélectif.

$$\text{Récupération (\%)} = \frac{C_f - C}{C_a} \times 100$$

où

C_f = concentration mesurée de l'organisme cible d'un échantillon fortifié

C = concentration mesurée de l'organisme cible d'un échantillon non fortifié

C_a = concentration de l'organisme cible ajoutée

6. Performance de la méthode

La performance de la méthode peut se mesurer à l'aide de la sensibilité, de la spécificité, du taux de faux positifs, du taux de faux négatifs et de l'efficacité. Les données de confirmation recueillies au cours des dernières années peuvent être utilisées par le laboratoire. Le résultat sera bien plus représentatif de la réalité de la méthode si l'on utilise un grand nombre de données.

La sensibilité est la fraction de tous les résultats positifs correctement déterminée dans le comptage présumé. La spécificité est la fraction de tous les résultats négatifs correctement déterminée dans le comptage présumé. Le taux de faux positifs est la fraction de positifs observés non correctement déterminée. Le taux de faux négatifs est la fraction de négatifs observés non correctement déterminée. L'efficacité est la fraction de colonies déterminée correctement.

6.1 Méthode de calcul de la performance

À l'aide des résultats des colonies typiques et atypiques présumées et confirmées, déterminer la performance de la méthode à l'aide des formules suivantes :

Sensibilité : $a/(a + b)$

Spécificité : $d/(c + d)$

Taux de faux positifs : $c/(a + c)$

Taux de faux négatifs : $b/(b + d)$

Efficacité : $(a + d)/n$

où

a = nombre de résultats présumés positifs et confirmés positifs (vrais positifs)

b = nombre de résultats présumés négatifs et confirmés positifs (faux négatifs)

c = nombre de résultats présumés positifs et confirmés négatifs (faux positifs)

d = nombre de résultats présumés négatifs et confirmés négatifs (vrais négatifs)

n = nombre total de colonies

Voir l'annexe III pour un tableau schématisant ces définitions.

7. Sélectivité de la méthode

La sélectivité est la caractéristique d'une méthode qui favorise la croissance de l'organisme désiré tout en retardant la croissance d'autres organismes n'offrant pas d'intérêt. Les données de confirmation recueillies au cours des dernières années peuvent être utilisées par le laboratoire. Le résultat sera bien plus représentatif de la réalité de la méthode si l'on utilise un grand nombre de données.

L'index de sélectivité est calculé à l'aide du rapport du nombre de colonies typiques, recherchées et observées, sur le nombre total de colonies isolées sur les milieux de culture pendant l'analyse. La sélectivité est meilleure lorsque l'index se rapproche de l'unité.

7.1 Méthode de calcul de la sélectivité

À l'aide des résultats de la confirmation des colonies typiques et atypiques effectuée lors du contrôle de la méthode, déterminer la sélectivité (F) à l'aide de la formule suivante :

$$F = ((a + c)/n)$$

où

a = nombre de résultats présumés positifs et confirmés positifs (vrais positifs)

c = nombre de résultats présumés positifs et confirmés négatifs (faux positifs)

n = nombre total de colonies

Références

- APHA-AWWA-WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21st Edition, American Public Health Association, American Water Works Association et Water Environment Federation, États-Unis, Washington, D.C., 2005.
- BORDNER, R., J. WINTER et P. SCARPINO. *Microbiological Methods for Monitoring the Environment. Water and Wastes*, United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 1998.
- BUREAU DE NORMALISATION DU QUÉBEC. *Eaux – Recherche et dénombrement de coliformes fécaux thermotolérants – Méthode par filtration sur membrane* (projet NQ 3600-115), Québec, Bureau de normalisation du Québec, 1992, 26 p.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Critères de variation relatifs (DR-12-CVR)*, Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2023, 36 p.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse : normes et exigences (DR-12-PALA)*, Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, 2012, 77 p.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie (DR-12-VMC)*, Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2021, 18 p.
- ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION. *ISO/TR 13843:2000 – Qualité de l'eau – Lignes directrices pour la validation des méthodes microbiologiques*, 1^{re} édition, Suisse, 2000, 47 p.
- ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION. *ISO 17994 – Qualité de l'eau – Critères permettant d'établir l'équivalence de méthodes microbiologiques*, 1^{re} édition, Suisse, 2004, 20 p.
- TAYLOR, J. K. *Quality Assurance of Chemical Measurements*, États-Unis, Lewis Publishers, 1987, 328 p.
- TAYLOR, J. K. *Statistical Techniques for Data Analysis*, États-Unis, Lewis Publishers, 1990, 220 p.

Annexe I

Formules

<p>Moyenne arithmétique des répliqués</p> $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$	<p>Écart type</p> $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}}$	
<p>Récupération</p> $\text{Récupération \%} = \frac{C_f - C}{C_a} \times 100$	<p>Répliquabilité</p> $\frac{t_{(0,975; n-1)} \times S_1}{\sqrt{n}}$	<p>Répétabilité</p> $\frac{t_{(0,975; n-1)} \times S_2}{\sqrt{n}}$
<p>Sensibilité</p> $a/(a + b)$	<p>Spécificité</p> $d/(c + d)$	<p>Taux de faux positifs</p> $c/(a + c)$
<p>Taux de faux négatifs</p> $b/(b + d)$	<p>Efficacité</p> $(a + d)/n$	<p>Sélectivité</p> $F = ((a + c)/n)$

Où

s = écart type

n = nombre de données sur lesquelles s'appuient les calculs

\bar{x} = moyenne arithmétique de n mesures

s_1 = écart type d'une série de mesures se référant à la répliquabilité

s_2 = écart type d'une série de mesures se référant à la répétabilité

C_f = concentration de l'organisme cible de l'échantillon fortifié

C = concentration de l'organisme cible de l'échantillon non fortifié

C_a = concentration de l'organisme cible ajoutée

F = index de sélectivité d'une méthode

$t_{(0,975; n-1)}$ = valeur du t de Student pour un intervalle bilatéral à un niveau de confiance de 95 % pour n échantillons

a = nombre de résultats présumés positifs et confirmés positifs (vrais positifs)

b = nombre de résultats présumés négatifs et confirmés positifs (faux négatifs)

c = nombre de résultats présumés positifs et confirmés négatifs (faux positifs)

d = nombre de résultats présumés négatifs et confirmés négatifs (vrais négatifs)

Annexe II

Valeur du t de Student pour un intervalle bilatéral à un seuil de confiance à 95 %

Degré de liberté ($n - 1$)	$t_{(0,975)}$
1	12,706
2	4,303
3	3,182
4	2,776
5	2,571
6	2,447
7	2,365
8	2,306
9	2,262
10	2,228
11	2,201
12	2,179
13	2,160
14	2,145
15	2,131
16	2,120
17	2,110
18	2,101
19	2,093
20	2,086
25	2,060
30	2,042
40	2,021
60	2,000

Tiré de John Keenan Taylor. *Quality Assurance of Chemical Measurements*, 1987, 328 p.

Note : Des tables statistiques plus complètes sont disponibles sur Internet.

Annexe III

**Tableau schématisant les vrais positifs, les vrais négatifs,
les faux positifs et les faux négatifs**

		Comptage présumé	
		+	-
Comptage confirmé	+	a	b
	-	c	d

a = nombre de résultats présumés positifs et confirmés positifs (vrais positifs)

b = nombre de résultats présumés négatifs et confirmés positifs (faux négatifs)

c = nombre de résultats présumés positifs et confirmés négatifs (faux positifs)

d = nombre de résultats présumés négatifs et confirmés négatifs (vrais négatifs)

Annexe IV

Approches proposées pour la validation des méthodes

Répliquabilité

Approche A : 10 analyses complètes pour **chaque** paramètre/matrice

Pour chaque technicien effectuant l'analyse :

1. Chaque technicien effectue 10 filtrations d'un même échantillon **réel (si la matrice contient l'organisme cible) ou fortifié** dans les mêmes conditions.
2. L'écart type des résultats obtenus est ensuite calculé.
3. L'écart type est entré dans le calcul de la répliquabilité.

Exemple :

Pour 10 filtrations effectuées sur le milieu m-Fc dans l'eau potable, la moyenne des coliformes fécaux observés est de 40 et l'écart type obtenu est de 3.

On effectue le calcul de la répliquabilité : $\frac{2,262 \times 3}{\sqrt{10}} = 2,1$

La répliquabilité est donc de 40 ± 2 , soit 5 %.

Ou

Approche B¹ : 10 filtrations pour **un** paramètre/matrice + 10 lectures de pétris pour **chaque** paramètre/matrice

Pour chaque technicien effectuant l'analyse :

1. Chaque technicien effectue 10 filtrations d'un même **échantillon réel (si la matrice contient l'organisme cible) ou fortifié** dans les mêmes conditions avec un seul milieu de culture.
2. L'écart type des résultats obtenus pour la filtration est ensuite calculé : s_F
3. Pour chaque milieu de culture utilisé pour les méthodes de membranes filtrantes, chaque technicien lit 10 fois une boîte de Pétri contenant un nombre de colonies se situant dans les limites de quantification de la méthode. Il est préférable d'utiliser un **échantillon positif naturel** ne présentant pas de confluence plutôt qu'un échantillon fortifié.
4. L'écart type des résultats obtenus pour la lecture est calculé : s_L
5. L'écart type total est calculé avec l'équation suivante : $(S_{\text{total}} = \sqrt{(S_F^2 + (S_L^2)})$
6. L'écart type total est entré dans le calcul de la répliquabilité. La moyenne arithmétique utilisée pour la double inégalité de l'intervalle de confiance bilatéral se doit d'être celle qui a été obtenue avec les résultats de filtration.

1. Cette approche n'est pas applicable pour l'analyse des bactéries hétérothropes aérobies et anaérobies (BHAA) par incorporation à la gélose.

Exemple :

Pour 10 filtrations effectuées sur le milieu m-Fc dans l'eau potable, la moyenne des coliformes fécaux observés est de 40 et l'écart type obtenu est de 3. Également, 10 lectures ont été effectuées sur le milieu m-endo avec un échantillon réel. La moyenne des lectures est de 60 avec un écart type de 2.

On calcul l'écart type total : $\sqrt{3^2 + 2^2} = 3,6$

On effectue le calcul de la réplicabilité : $\frac{2,262 \times 3,6}{\sqrt{10}} = 2,58$

La réplicabilité pour le milieu m-endo est donc de 40 (valeur de la filtration) \pm 3, soit 7,5 %.

Répétabilité

Pour la répétabilité, une seule approche est possible étant donné que les 10 conditions différentes sont reliées davantage à la filtration et à l'incubation, donc 10 analyses complètes pour chaque paramètre/matrice.

1. 10 filtrations d'un même échantillon **réel (si la matrice contient l'organisme cible) ou fortifié** sont effectuées avec une combinaison de **10 conditions différentes** (analystes, lot de fabrication de milieu de culture, lot d'eau de rinçage, lot de membranes filtrantes, incubateur, moment de la journée (matinée ou après-midi), poste de travail, etc.).
2. L'écart type des résultats obtenus est ensuite calculé.
3. L'écart type est entré dans le calcul de la répétabilité.

Exemple :

Pour 10 filtrations effectuées sur le milieu m-Fc dans l'eau potable avec 10 conditions différentes, la moyenne des coliformes fécaux observés est de 40 et l'écart type obtenu est de 5.

On effectue le calcul de la répétabilité : $\frac{2,262 \times 5}{\sqrt{10}} = 3,6$

La répétabilité est donc de 40 \pm 4, soit 10 %.

Note 1 : La réplicabilité et la répétabilité doivent être effectuées par matrice pour tenir compte des dilutions requises dans l'eau usée. Par exemple, un laboratoire qui est accrédité pour les coliformes totaux (domaines 1 et 31) doit produire des données de réplicabilité et de répétabilité pour un volume de 100 ml (domaine 1) et pour des volumes de 50, 10 et 1 ml, selon les dilutions utilisées par le laboratoire (domaine 31).

Note 2 : Les laboratoires qui utilisent des milieux combinés doivent fournir des données de réplicabilité et de répétabilité pour les coliformes totaux et pour *E. coli*. Si un échantillon fortifié est utilisé, les deux souches microbiennes doivent être utilisées.



**Environnement,
Lutte contre
les changements
climatiques,
Faune et Parcs**

Québec 