
**VALIDATION DES MÉTHODES MICROBIOLOGIQUES ET CHIMIQUES DE CONTRÔLE
DES LIEUX DE TRAVAIL**

Dr Nicole Nolard
Dr Camille Chasseur
Institut Scientifique de la Santé publique

Prof. Michel Marlier
Prof. Georges Lognay
Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION	2
I.1. Contexte et cadre général de la recherche	2
I.2. Objectifs de la recherche – Axes directeurs	2
II. CADRE THEORIQUE	3
II.1. Les champignons et les levures	3
II.2. Les bactéries	4
III. METHODES	4
III.1. Population d'étude	4
III.2. Mesures	5
III.3. Procédures d'analyses	8
IV. RESULTATS	12
IV.1. Développements expérimentaux	12
IV.2. Mesures sur sites	23
V. DISCUSSION.....	46
VI. ANNEXES	47

Promoteur: Dr. Nicole Nolard
Section de Mycologie
Institut Scientifique de Santé Publique
14, rue Juliette Wytsman
1050 - Bruxelles
Tél.: 02/642 55 17
Fax.: 02/642 55 19
n.nolard@iph.fgov.be

Coordonnées des membres du réseau :

Dr Camille Chasseur
Section de Mycologie
Institut Scientifique de Santé Publique
14, rue Juliette Wytsman
1050 - Bruxelles
Tél.: 02/642 55 10
Fax.: 02/642 55 19
c.chasseur@iph.fgov.be

Professeur Michel Marlier
Unité de Chimie générale et Organique
Faculté universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux
2, Passage de Déportés
5030 Gembloux
Tél : 081/62.22.26
Fax : 081/62.22.27
m.marlier@fsagx.ac.be

Professeur Georges Lognay
Unité de Chimie générale et Organique
Faculté universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux
2, Passage de Déportés
5030 Gembloux
Tél : 081/62.22.90
Fax : 081/62.22.27
lognay.g@fsagx.ac.be

I. INTRODUCTION :

I.1. CONTEXTE ET CADRE GENERAL DE LA RECHERCHE

Les problèmes de bio-contamination dans les environnements intérieurs (habitats et lieux de travail) ont conduit à une prise de conscience de leur impact sur la santé et de la difficulté à cerner les différents paramètres.

La généralisation de la climatisation, en particulier, a entraîné l'apparition d'un certain nombre de plaintes et de pathologies. En 1990, le laboratoire de mycologie de l'ISP s'est vu confié un programme d'évaluation dans ce domaine. Il s'agissait de caractériser le niveau de bio-contamination dans les bâtiments équipés d'air conditionné en Belgique. Une deuxième phase de cette étude a été poursuivie dans le but d'améliorer les méthodes d'analyses et de proposer des stratégies de remédiation (expérimentation de procédés de désinfection, établissement de cahier de maintenance microbiologique, etc.). A l'issue de ces 2 actions de recherche successives, il est apparu prioritaire de développer un système d'information vis-à-vis des médecins du travail, des responsables SIPP, et des services de maintenance. Afin de rencontrer ce besoin, des séminaires de formation et un site Internet ont été mis en place. L'information a été systématiquement complétée et entretenue en fonction des progrès réalisés. Il s'agissait de développer une plate-forme donnant accès à de multiples informations relatives aux bâtiments équipés d'installations de traitement d'air. Dans sa déclinaison la plus récente, cette recherche à long terme sur les environnements de lieux de travail vise à développer, de manière concertée, des méthodes diagnostiques complémentaires conjuguant les qualités intrinsèques des méthodes microbiologiques classiques et des analyses chimiques permettant le dosage et l'identification d'indicateurs biochimiques spécifiques. Dans cette optique, un partenariat entre l'ISP et la FUSAGx a été concrétisé par un nouveau programme de recherche dont les résultats constituent une avancée significative dans l'analyse objective des causes potentielles de risques et ouvre des perspectives nouvelles tant dans le domaine de la climatisation que dans d'autres types d'environnements de travail. La thématique abordée et les axes stratégiques choisis sont en congruence avec les préoccupations d'ordre similaire au niveau européen voir même mondial. Le nombre d'informations scientifiques et de vulgarisation disponibles via les médias (littérature scientifique, articles de synthèse, sites Internet, etc.) en sont autant de preuves. A l'heure actuelle, l'intérêt des autorités sanitaires et du public pour ce qui tient à la bio-contamination et aux risques associés, va croissant et l'actualité démontre l'importance de ce domaine d'investigation (Légionellose, Sick Building Syndrome).

I.2. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE – AXES DIRECTEURS

L'objectif de ce programme de recherche consiste à développer des outils analytiques objectifs et performants permettant d'évaluer l'occurrence d'agents biologiques (fongiques et bactériens) et chimiques (ergostérol, mycotoxines, MVOCs, endotoxines, etc.) produits par les moisissures et les bactéries, et susceptibles d'être délétères dans le milieu du travail.

Cette recherche s'articule autour de 2 axes complémentaires:

- a. L'identification des facteurs de risques liés à la présence et à la propagation de micro-organismes dans les lieux de travail. Ces risques peuvent être liés aux micro-organismes eux-mêmes ou aux composés chimiques qu'ils produisent. Il s'agit ici de compléter les approches diagnostiques préventives et interventionnistes qui relèvent plus strictement de la mycologie. Plus spécifiquement, les développements relatifs aux aspects microbiologiques concernent les modes de prélèvements, la mise en œuvre de milieux supplémentaires adaptés, l'affinement de valeurs centiles dégagées des travaux

antérieurs ainsi que la diversification des sites investigués. Dans une démarche intégrée à l'ensemble des prérogatives des 2 équipes de recherche, l'ISP a assuré l'extension du site web indoorpol.be de manière à couvrir un plus large domaine lié à la bio-contamination (secteurs industriel et agricole, hôpitaux, école, crèches, piscines et centres de loisirs, etc.)

- b. Parallèlement, la quantification des bio-marqueurs fongiques (ergostérol, MVOC, etc.) a été envisagée par la FUSAGx avec la mise au point et validation de procédures chromatographiques et spectrométriques. La mise en œuvre de celles-ci dans le cadre du suivi de systèmes de conditionnement d'air a pour but de définir des seuils objectifs (valeurs centiles) permettant d'inciter aux mesures préventives et correctives à prendre. En parallèle avec l'ISP, l'approche d'autres lieux de travail s'est diversifiée. Une recherche analytique documentaire à la fois scientifique et technique est intégrée de manière complémentaire au projet afin de mettre à la disposition des acteurs de terrain l'information disponible.

Le projet repose sur un ensemble de démarches concertées entre les deux partenaires et met en évidence l'interdisciplinarité nécessaire. Dans l'évolution des travaux, le collège d'experts a été sollicité tous les 6 mois et a pu vérifier l'état d'avancement des travaux et suggérer des orientations spécifiques dont il a été tenu compte. Un synoptique des recherches et un rapport détaillé ont été fournis respectivement tous les semestres et chaque année.

II CADRE THEORIQUE

La qualité de l'air sur le lieu de travail constitue une source de risque qui a été longtemps sous-estimée. L'amélioration de nos connaissances des maladies professionnelles et des ambiances en milieu de travail ainsi que la reconnaissance des pathologies liées a permis d'accorder plus d'importance à l'étude des agents spécifiques de ces milieux et de leurs effets sur la santé.

Le champ du risque biologique couvre des risques liés à des agents de nature très différente allant d'organismes multicellulaires comme les champignons à des molécules protéiques comme les prions. En ce qui concerne la contamination des environnements intérieurs, la problématique est extrêmement complexe car "diffuse". En effet, il n'est pas aisé de mettre en relation une contamination microbiologique avec des pathologies aussi diverses que l'infection (*Legionella*), l'allergie, ou l'intoxication. En ce qui concerne ces deux derniers cas, les moyens d'investigations doivent intégrer l'évaluation de la fonge totale vivante et morte. Il en va de même pour les bactéries et les autres micro-organismes.

II.1 LES CHAMPIGNONS ET LES LEVURES

Il s'agit d'organismes uni ou pluri-cellulaires eucaryotes, saprophytes, symbiotiques ou parasites. Ils se propagent notamment en produisant des spores. Le facteur critique de développement des moisissures est la disponibilité en eau du substrat.

Les pathologies liées aux moisissures peuvent être d'ordre cutané, digestif, et surtout respiratoire en ce qui concerne les environnements intérieurs.

Les effets toxiques, irritants et allergiques sont liés à l'occurrence et à la nature chimique de divers constituants cellulaires tels que certains éléments de la paroi cellulaire des spores fongiques, les mycotoxines, les composés organiques volatils ou encore les allergènes d'origine

protéique. L'impact lié à chacun de ces agents et les mécanismes physiopathologiques sont souvent mal connus.

Les moisissures synthétisent un stérol très spécifique (ergostérol) qui est un élément structural des membranes. En raison de cette spécificité, l'utilisation de l'ergostérol comme bio-marqueur se trouve justifiée. Par ailleurs, des métabolites volatils tout aussi spécifiques comme la géosmine ou le 2-éthyl-hexanol, sont des indicateurs de la présence active des moisissures.

II.2 LES BACTERIES

Ce sont des organismes procaryotes dont l'importance en Indoor Pollution se situe principalement au niveau des toxines qu'elles libèrent. Dans le cadre de ce programme, seules les bactéries Gram- ont été investiguées. Le dénombrement total des bactéries est aussi un critère objectif de contamination. Plus spécifiquement, les bactéries Gram- sont une source d'endotoxines (constituants de leur paroi extérieure). Les endotoxines sont des lipopolysaccharides potentiellement pyrogènes dont la concentration peut être mesurée et mise en relation avec un facteur potentiel de risque pour la santé humaine. La recherche de ces molécules s'avère également importante sur des lieux de travail spécifiques.

Certaines bactéries filamenteuses appelées actinomycètes et plus spécifiquement les espèces thermophiles telle que *Thermoactinomyces vulgaris* sont impliquées dans des cas d'alvéolite allergique extrinsèque.

III METHODE

Les méthodes mises en œuvre dans la présente recherche visent à paramétrer objectivement l'état microbiologique des environnements investigués et de là, à élaborer des valeurs guides utiles pour définir le niveau potentiel de bio-contamination des lieux de travail. A la démarche d'investigation classique – mais indispensable - utilisant les dénombrements et les identifications microbiologiques courantes, des méthodes biochimiques ont été ajoutées de manière à mieux percevoir l'importance de la fraction des micro-organismes morts et de leurs débris potentiellement délétères principalement en terme d'allergénicité et de toxicité.

Un travail de mise à disposition d'une information objective et didactique a également été effectué dans le but de satisfaire les principaux acteurs de terrain (médecins, responsables SIPP (Service Interne de Prévention et Sécurité au travail), etc.) ainsi que le public, au sens le plus large du terme. Le site web initialement construit grâce à un programme PSF (Politique Scientifique Fédérale) (ST 50/13) et concernant les immeubles à bureaux a, dans le cadre du présent programme, été étendu aux environnements intérieurs approchés.

En parallèle, une veille bibliographique a été entretenue dans le but de compléter systématiquement l'information scientifique sur le sujet. C'est ainsi que des travaux synoptiques jugés pertinents et particulièrement utiles ont été mentionnés sur le site web développé.

III.1. POPULATION D'ETUDE

Pour une efficacité optimale des démarches liées à la santé-sécurité des travailleurs, la législation belge prévoit une série de mesures diversifiées favorisant autant que possible les conditions de travail. Dans ce contexte, la bio-contamination et les facteurs de risques apparentés constituent un vaste champ d'investigation où la démarche scientifique vient en appui d'une réflexion stratégique plus vaste qui intègre à la fois la prévention des risques et la mise en place de mesures correctives. Il s'agit de limiter les risques liés à la prolifération des

micro-organismes dont les métabolites ou les débris cellulaires exposent les travailleurs à divers désagréments dont l'occurrence, souvent perçue de manière diffuse est difficile à cerner. La démarche de cette recherche vise à la mise en place de procédures, d'examens, et de contrôles des lieux de travail en s'appuyant sur l'usage de techniques microbiologiques éprouvées et la recherche analytique de bio-marqueurs spécifiques aux micro-organismes.

Parmi les bio-marqueurs intéressants, ce programme de recherche propose la mise au point d'une méthodologie permettant de déterminer l'**ergostérol**, molécule spécifique au Règne fongique. Cette molécule a été dosée dans de nombreux humidificateurs et les résultats ont été confrontés avec ceux des analyses fongiques sur milieu gélosés. Des valeurs seuil provisoires ont pu être dégagées. Il en va de même en ce qui concerne les **endotoxines bactériennes** qui sont recherchées en tant que toxines mais aussi en tant que bio-indicateurs des bactéries Gram-. Des valeurs seuil ont également été dégagées pour l'eau des humidificateurs.

Dans la partie "industrielle" de la recherche, une approche spécifique des fluides de coupe a été envisagée. En effet, ces milieux riches en substances organiques sont pulvérisés sous forme d'aérosols et sont généralement recyclés de nombreuses fois. Ils constituent un milieu favorable à l'amplification des micro-organismes. Les analyses microbiologiques ont confirmé l'existence d'une charge bactérienne et/ou fongique parfois excessivement élevée. Dans une approche originale, ces fluides ont été étudiés aussi bien pour leur teneur en ergostérol (d'origine fongique) qu'en endotoxines, bio-marqueurs bactériens spécifiques (bactéries Gram-).

D'autre part, des systèmes d'échantillonnage et d'analyse de métabolites secondaires produits par les moisissures (**MVOCs**) ont également été effectués.

L'ensemble de ces expérimentations a été mené dans les lieux de travail suivants :

- Bâtiments à usage de bureaux, avec ou sans air conditionné
- Bâtiments avec archives, livres
- Bâtiments à usage industriel (fluide de coupe)
- Laboratoire manipulant des matières contaminées
- Bâtiment à usage agroalimentaire (minoterie)

III.2. MESURES

Les méthodes de prélèvements et d'analyses microbiologiques classiques mis au point dans les travaux précédents et utilisés de manière routinière à l'ISP ont été adaptés selon les circonstances et systématiquement améliorés. Elles sont présentées sous formes de fiches de procédure à l'annexe A. Un synoptique des moyens d'investigation utilisés peut être visualisée sur la nouvelle version du site web www.indoorpol.be.

III.2.1. Echantillonnage de l'air pour analyses microbiologiques (germes revivifiables)

Procédure ISP/MYC/AC01 & 03

- *Matériel*: l'impacteur utilisé est le RCS+ de Biotest, utilisant des languettes souples remplies d'un milieu gélosé spécifique. Le volume de base prélevé à l'intérieur des bâtiments est de 80 litres d'air. A l'extérieur, en été, ce volume peut être diminué de moitié.

- *Prélèvement*: Dans les bureaux, l'air est prélevé généralement à 20 cm de la grille de pulsion (air pulsé) en tenant compte de l'inclinaison des déflecteurs, et à la hauteur des tables de travail, c'est-à-dire au niveau de la respiration en position assise (air ambiant).

Durant l'enquête, un prélèvement d'air extérieur est toujours effectué au niveau de la prise d'air

afin de servir de contrôle.

- *Domaine d'application*: bureaux sans conditionnement d'air, tout environnement de travail avec adaptation des volumes de prélèvement, habitat, ...

III.2.2. Echantillonnage de l'air pour dosage de l'ergostérol

Procédure AIR/ERG/1

- *Matériel*: échantillonnage sur filtre en polycarbonate (aspiration à l'aide d'une pompe SKC, 5l/min), avec Impiger contenant une solution peptonée ou avec MAS-100 dont le milieu gélosé a également été remplacé par une solution peptonée.

- *Prélèvement*: les échantillonnages sur filtres ainsi que ceux réalisés avec la méthode Impiger utilisent un débit de pompe de 3 l/min pendant 4 heures, soit environ 720 litres d'air prélevé. Avec le MAS-100 (débit est de 100l/min), les prélèvements sont réalisés pendant 5 minutes, soit 500 litres d'air prélevé.

Dans les deux derniers cas, la solution est ensuite récupérée dans un flacon stérile contenant 1 ml de solution phénolique (glycérol (10) : eau (90)) à 0.2 %.

- *Domaine d'application*: tout environnement de travail avec adaptation des volumes de prélèvement, habitat, etc.

III.2.3. Echantillonnage de l'air pour analyses des MVOC

Procédure AIR/MVOC/1

- *Matériel*: échantillonnage par solid-phase micro-extraction (SPME), ou par piégeage des MVOCs sur adsorbants spécifiques et élution par solvants.

- *Prélèvements*: exposition de fibres SPME (type PDMS et Carboxène) pendant 4 heures

- *Domaine d'application*: tout environnement de travail avec adaptation des volumes de prélèvement, habitat, etc.

III.2.4. Echantillonnage de la poussière déposée sur support lisse, pour analyses microbiologiques (germes revivifiables)

Procédure ISP/MYC/AC04

- *Matériel*: la poussière fine de l'air déposée est collectée sur un plaque de verre (20cm x 20cm), préalablement lavée avec un solution d'alcool et déposée sur les meubles dans un bâtiment.

- *Prélèvements*: après 7 jours, des échantillons de surface sont réalisés à partir d'un kit de boîtes RODAC (23.74 cm²) remplies avec des milieux gélosés spécifiques. Ces boîtes sont appliquées à l'aide d'un applicateur automatique permettant une pression de 25 gr/cm² pendant 10 secondes (ISO DIS 14698-1). Elles sont ensuite ramenées au laboratoire pour y être incubées à des températures appropriées.

- *Domaine d'application*: bureaux sans conditionnement d'air, tout environnement de travail avec adaptation des milieux de culture et t° d'incubation, habitat, etc.

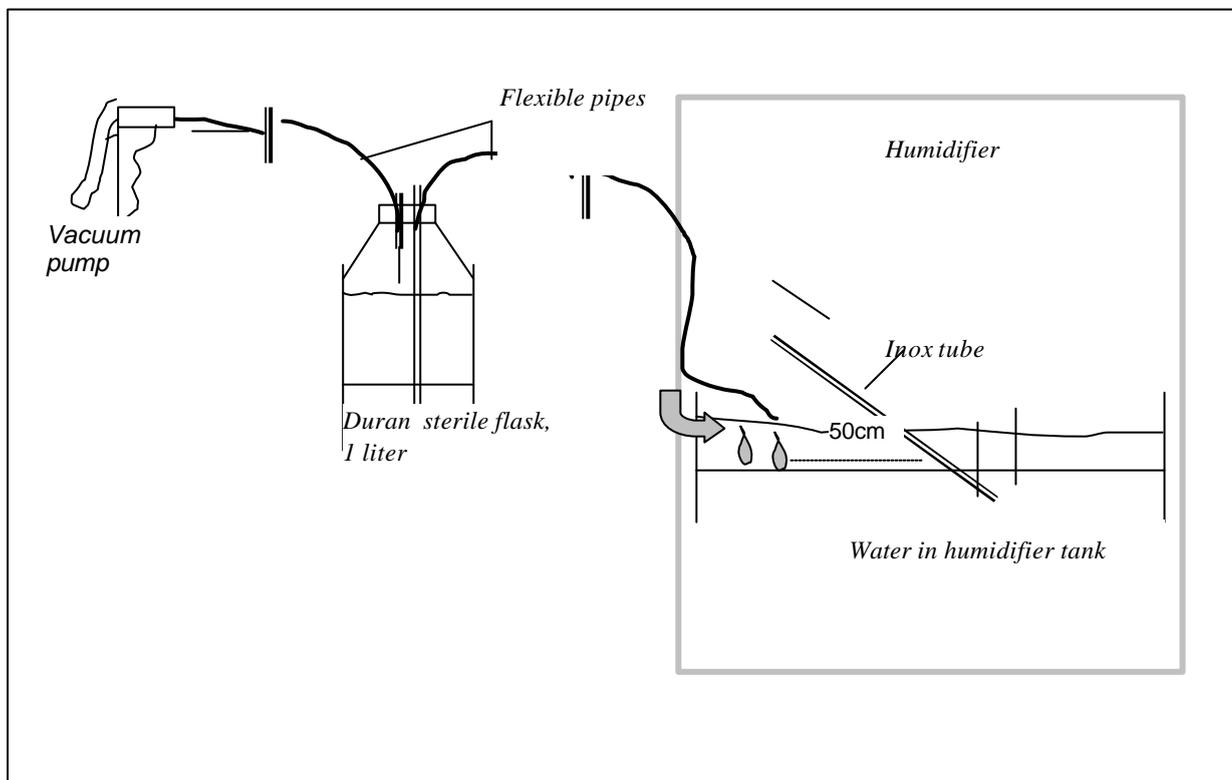
III.2.5. Echantillonnage des liquides pour analyses microbiologiques (germes revivifiables)

Procédure ISP/MYC/AC05

- *Matériel*: le liquide est prélevé à partir d'un système de 2 tuyaux stériles raccordés à un récipient en verre stérile d'un litre mis en dépression avec une pompe.

- *Prélèvement d'eau dans les humidificateurs*: le système de 2 tuyaux métalliques est placé de telle manière à ce que le guide métallique touche le fond du bac. De cette façon, l'embout du premier tuyau est situé à 1 cm du fond du bac (récolte de l'eau avec d'éventuels dépôts) et le second tube à 5 cm du fond (voir annexe A); le prélèvement est réalisé en effectuant une translation du tube métallique dans le bac, en veillant à ne pas prélever à proximité de l'admission d'eau fraîche.

Figure 1: Simple system for sampling water in humidifier tank



- *Domaine d'application*: eau dans les humidificateurs, eaux des tours de refroidissement. Procédure également applicable aux fluides d'usinage dilués (eau blanche), eaux industrielles diverses, etc.

Cet échantillonnage permet la recherche des moisissures et bactéries ainsi que les mesures physico-chimiques tels que pH, conductivité et l'ATP.

III.2.6. Echantillonnage des liquides pour dosage de l'ergostérol

Procédure

- *Matériel*: le liquide est prélevé à partir d'un système de 2 tuyaux stériles raccordés à un récipient en verre stérile d'un litre, préalablement rincé avec du méthanol, mis en dépression avec une pompe.
- *Prélèvement d'eau dans les humidificateurs*: le système de 2 tuyaux métalliques est placé de telle manière à ce que le guide métallique touche le fond du bac. De cette façon, l'embout du premier tuyau est situé à 1 cm du fond du bac (récolte de l'eau avec d'éventuels dépôts) et le second tube à 5 cm du fond (voir annexe A); le prélèvement est réalisé en effectuant une translation du tube métallique dans le bac, en veillant à ne pas prélever au niveau de l'admission d'eau fraîche.
- *Domaine d'application*: eau dans les humidificateurs, eaux des tours de refroidissement. Procédure également applicable aux fluides d'usinage dilués (eau blanche), eaux industrielles diverses, ...

III.2.7. Echantillonnage des liquides pour dosage des endotoxines

Procédure

- *Matériel*: pipette apyrogène de 50ml fixée sur un petite pompe. Flacons de 50 ml dont le caractère apyrogène a été démontré à l'aide du test LAL. Pipette et flacon sont à usage unique.
- *Prélèvement*: une prise de 50 ml est réalisée en veillant à introduire directement l'échantillon dans un flacon adapté. Celui-ci est conservé pendant un maximum de 15 jours à -20°C .
- *Domaine d'application*: eau dans les humidificateurs, eaux des tours de refroidissement. Procédure également applicable aux fluides d'usinage dilués (eau blanche), eaux industrielles diverses, etc.

III.2.8. Echantillonnage des poussières de moquette et supports apparentés, pour analyses microbiologiques et biochimiques

Procédure ISP/MYC/AC06

- *Matériel*: un aspirateur de 1200W équipé d'un embout porte filtre. Filtre " 3M filtrete ", (MC/US/diam 57 mm/PB). Le filtre est préalablement pesé.
- *Prélèvement*: la poussière est aspirée pendant 2 minutes sur une surface de 1m^2 .
- *Domaine d'application*: poussière de moquette, de matelas, de fauteuil, etc.

III.3. PROCEDURES D'ANALYSES

Les procédures d'analyses décrites ci-dessous mettent en évidence la complémentarité des approches microbiologiques et biochimiques. En effet, les premières rendent compte de la microflore vivante ou revivifiable, les secondes contribuent à mesurer l'ensemble des constituants fongiques (cellules vivantes, débris cellulaires et spores vivantes ou non) et bactériens. Un dernier aspect concerne la mesure de paramètres chimiques susceptibles de contribuer à un diagnostic précis.

III.3.1. Analyses microbiologiques (microflore revivifiables)

Air et surfaces

Procédures ISP/MYC/AC01 & 03 & 4

Germes recherchés

- Les **moisissures mésophiles et hygrophiles** (isolées à 25°C et se développant sur des matériaux très disponibles en eau libre avec un a_w élevé). Parmi les espèces rencontrées, on trouve les espèces phytopathogènes dont l'origine est strictement extérieure (*Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea*, etc.) et celles pouvant se développer à l'intérieur à des endroits présentant une humidité anormalement élevée (*Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus versicolor*, *Stachybotrys chartarum*, etc.), voire dans l'eau (*Exophiala*).
- Les **moisissures mésophiles et xérophiles** (isolées à 25°C et se développant sur des matériaux peu disponibles en eau libre avec un a_w faible). Parmi les espèces xérophiles, le genre *Penicillium* ou *Aspergillus* (*A. glaucus gr.*) sont les plus fréquemment isolés à l'intérieur des bâtiments.
- Les **moisissures thermophiles** (isolées à 45°C). Ces moisissures se développent principalement au cours de processus de décomposition de la matière organique avec dégagement de chaleur. Très abondantes dans les processus de compostage, dans la terre (*Aspergillus fumigatus*), leur origine dans les bâtiments à bureaux est le plus souvent extérieure.
- Le **dénombrement total des bactéries se développant sur TSA à 25°C** : il s'agit en majorité des bactéries susceptibles de se développer dans l'environnement. Présentes en quantités élevées elles traduisent une contamination au niveau du site.
- Le **dénombrement total des bactéries se développant sur TSA à 37°C** : il s'agit en majorité de bactéries d'origine humaine. Présentes en quantités élevées dans un bâtiment, elles traduisent une ventilation insuffisante et/ou un environnement surpeuplé.
- Le **dénombrement total des bactéries Gram-** : ces bactéries sont responsables de la présence des endotoxines dans l'environnement

La recherche de bactéries plus spécifiques sort du cadre de cette approche préliminaire.

Tableau 1 : Milieux de culture, température et temps d'incubation en fonction des germes recherchés (air et surface)

Moisissures - Air	Milieux gélosés	t° incubation	Durée incubation
Moisissures totales mésophiles hygrophiles	HS + DRBC (en été)	25°C	5 jours
Moisissures totales mésophiles xérophiles	DG18 de Biotest	25°C	5 jours
Moisissures totales thermophiles	YM de Biotest	45°C	2 jours
Moisissures - Surface			
Moisissures totales mésophiles hygrophiles	MC + DRBC	25°C	5 jours
Moisissures totales thermophiles	MC	45°C	2 jours
Bactéries-Air, surface			
Bactéries totales de l'environnement	Milieux gélosés TC de Biotest TSA actidione	t° incubation 25°C	Durée incubation 5 jours
Bactéries totales d'origine humaine	TC de Biotest	37°C	2 jours
Bactéries Gram-	Mac Conkey Agar	37°C	2 jours

Liquides

Procédure ISP/MYC/AC05

Les mêmes germes revivifiables sont recherchés et cultivés sur les mêmes milieux gélosés que pour les surfaces (Tableau 2)

Les bactéries

L'eau estensemencée par étalement sur du TSA. Les dilutions de base utilisées sont 10-1, 10-2, 10-3, 10-4. Deux séries de boîtes sont préparées, l'une étant incubée à 37°C, l'autre à 25°C. Des dilutions supplémentaires peuvent être ajoutées suivant les cas.

Les moisissures

L'eau estensemencée par inclusion dans du MEA chloramphénicol que l'on verse (<50°C !!) sur l'échantillon. Les dilutions de base utilisées sont: 5ml, 1 ml, 10-1, 10-2. Deux séries de boîtes sont préparées, l'une étant incubée à 37°C, l'autre à 25°C. Des dilutions supplémentaires peuvent être ajoutées suivant les cas.

Les thermoactinomycètes

L'eau est filtrée sur 2 milliflex (0.45 µm), à raison de, respectivement, 50 et 250ml. Les cassettes sont ensuite remplies avec du TSA + Actidione.

Tableau 2: Milieux de culture utilisés, températures et temps d'incubation en fonction des germes recherchés (Eau d'humidification)

Germes	Milieux gélosés	t° incubation	Durée d'incubation
Moisissures totales hydrophiles	MEA chloramphénicol	25°C	5 jours
Bactéries totales de l'environnement	TSA (ou TSA Actidione)	25°C	5 jours
Bactéries totales d'origine humaine	TC de Biotest	37°C	2 jours
Bactéries Gram-	Mac Conkey Agar	37°C	2 jours
Thermoactinomycètes	TSA novobiocine	52°C (humide)	2 jours

Spécificité des protocoles suivant les matrices analysées

Eau d'humidification : sont ajoutés les mesures de pH et de conductivité, l'examen des dépôts, le dosage des endotoxines et de l'ergostérol.

Fluides de coupe dilués (eau blanche): les échantillons sont dispersés dans du tween 80 à 0,01% avant de procéder par dilutions successives. Sont également ajoutés les dosages des endotoxines et de l'ergostérol.

Poussières de moquette et supports apparentés

Procédure ISP/MYC/AC06

Au laboratoire, le filtre est repesé après échantillonnage. La différence donne le poids de poussière récoltée. Une solution aqueuse stérile de tween 80 (0,02%) est ajoutée de manière à fixer la concentration de départ à 10-2 (par exemple, à 0.492 gr de poussière, on ajoute 49.2 ml de solution). L'ensemble est ensuite agité à vitesse modérée (agitateur latéral) pendant 20 minutes à température ambiante. L'ensemencement sur milieux gélosés adéquats est effectué par dilutions successives (10-2, 10-3, 10-4, 10-5) et les boîtes sont ensuite incubées.

Germes recherchés systématiquement:

- Les **moisissures mésophiles hygrophiles** (isolées à 25°C et se développant sur des matériaux très disponibles en eau libre avec un aw élevé). Parmi les espèces rencontrées, on trouve les espèces phytopathogènes dont l'origine est strictement extérieure (*Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea*, etc.) et des espèces pouvant se développer à l'intérieur à des endroits présentant un humidité anormalement élevée (*Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus versicolor*, *Stachybotrys chartarum*, etc.), voire dans l'eau (*Exophiala*).
- Les **moisissures mésophiles xérophiles** (isolées à 25°C et se développant sur des matériaux peu disponibles en eau libre avec un aw faible). Parmi les espèces xérophiles, le genre *Penicillium* ou *Aspergillus* (*A. glaucus* gr.) sont les plus fréquemment isolés à l'intérieur des bâtiments.

Germes recherchés dans des environnements spécifiques

- Les **moisissures thermophiles (isolées à 45°C)**
- Le **dénombrement total des bactéries se développant sur TSA à 25°C**
- Le **dénombrement total des bactéries se développant sur TSA à 37°C**
- Le **dénombrement total des bactéries Gram-**

Tableau 3: Milieux de culture utilisés, températures et temps d'incubation en fonction des germes recherchés (poussière)

Moisissures - Air	Milieux gélosés	t° incubation	Durée incubation
Moisissures totales mésophiles hygrophiles	MC + DRBC (en été)	25°C	5 jours
Moisissures totales mésophiles xérophiles sur milieu sucré	M40Y	25°C	5 jours
	M40Y+NaCl	25°C	5 jours

III.3.2. Analyses biochimiques (recherche de bio-marqueurs)

ATP :

L'ATP, en tant que molécule énergétique de base utilisée par tous les êtres vivants est utilisé en tant que bio-marqueur lié à l'occurrence de matériel biochimique issu d'organismes vivants ou morts.

Test Hi-lyte.

Milieux concernés : eau, fluides de coupe dilués.

Endotoxines

Les endotoxines sont des lipopolysaccharide (LPS) constitutifs de la paroi des bactéries Gram- et sont pour une part responsables de leurs propriétés toxiques. L'intérêt du dosage est double: en raison de leur toxicité propre d'une part et, d'autre part, en tant que bio-marqueur bactérien Gram-.

Test LAL direct ou chromogénique. Les méthodes chromogéniques du test LAL (méthodes cinétiques et méthode " point final " à 405 nm, méthode " point final " avec couplage diazoté à 545 nm) ont été comparées en termes de répétabilité et de linéarité. Les méthodes par gélification et turbidimétriques n'ont pas été exploitées lors de cette étude.

Milieux concernés : eau, fluides de coupe dilués

Ergostérol

C'est le stérol membranaire majoritaire des levures et des champignons, ce qui le rend intéressant en tant que bio-marqueur fongique. Comme pour les endotoxines, il s'agit d'un bio-marqueur de la charge TOTALE de la fonge, revivifiable ou non.

Dosage: chromatographie en phase gazeuse et GCMS.

Milieux concernés: eau, fluides de coupe dilués, poussières, matériaux divers.

MVOC

Les métabolites volatils d'origine fongique permettent de déceler des moisissures et constituent en fonction de leur nature un risque potentiel indirect de toxicité. C'est à ce double titre qu'ils sont recherchés mais non dosés.

Analyse: par GCMS.

Milieux concernés: air.

Mycotoxines

Les mycotoxines représentent une gamme très vaste de métabolites secondaires. Selon les genres et les espèces, ils diffèrent considérablement, aussi bien en ce qui concerne leur structure chimique que leurs propriétés sur les organismes vivants.

Analyse: par tests Elisa et confirmation spectrométrique.

Milieux concernés : céréales manipulées en laboratoire.

IV. RESULTATS

IV.1. Développements expérimentaux

Tout au long de la convention de recherche, une attention particulière a été consacrée aux aspects méthodologiques. Cette action continuée a débouché sur des modes opératoires validés et sur des améliorations qui seront mises en perspective dans les conclusions (chapitre V)

IV.1.1. Détermination de la teneur en ergostérol des spores de moisissures différentes

Dans une approche préliminaire, le dosage de l'ergostérol a été développé sur base des données issues de la littérature et par une évaluation comparative de diverses méthodes chromatographiques qui ont guidé les choix techniques. L'ergostérol étant inclus dans des bicouches lipidiques et potentiellement présent sous forme d'esters, la libération de la molécule nécessite obligatoirement une saponification des échantillons suivie d'une extraction par solvant la plus efficace possible. A ces impératifs est également liée la nécessité de développer une méthode rapide compte tenu du nombre d'analyses à réaliser. C'est pourquoi une première

étape a consisté en la mise au point d'une méthodologie d'extraction assistée par micro-ondes (EAM).

Divers échantillons de biomasses lyophilisées et de spores issues d'espèces fongiques rencontrées dans les lieux de travail ont été étudiés. Il ressort que les quantités d'ergostérol retrouvées suite à l'application de micro-ondes sont plus importantes. Cela démontre une meilleure efficacité de ce procédé par rapport aux techniques classiques (chauffage à reflux des échantillons) qui se sont révélées mal adaptées à la problématique étudiée. En effet, elles nécessitent l'utilisation de larges quantités de réactifs et de solvants et sont longues à mettre en oeuvre. Bien que performantes, elles se sont révélées inadéquates. La méthode rapide par EAM conduit à des résultats d'une répétabilité acceptable compte tenu de l'hétérogénéité des biomasses lyophilisées et des échantillons de spores en suspension (Tableau 4 a et b.).

Tableau 4: Teneurs en ergostérol de biomasses et de spores issues de souches fongiques contaminant les lieux de travail.

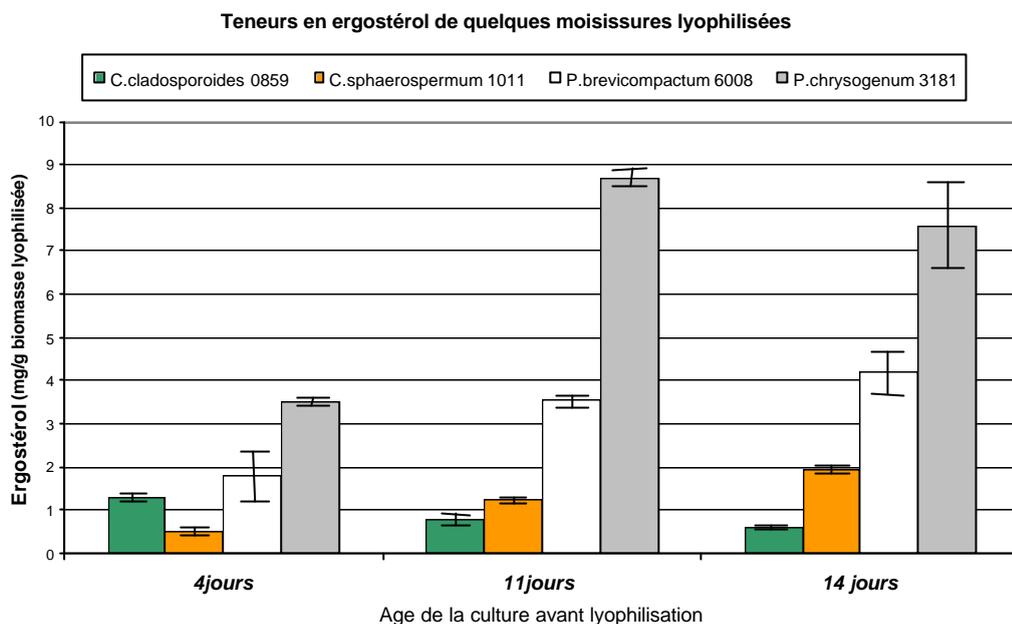
a. Moisissure sous forme lyophilisée (N° IHEM)		Ergostérol (mg/g)*
Milieu humide	<i>F. solanii</i> (2813)	7.8 ± 0.4
Milieu aérien	<i>A. alternata</i> (4706)	3.5 ± 0.2
	<i>C. cladosporioides</i> (0859)	0.6 ± 0.0
	<i>C. herbarum</i> (3260)	0.8 ± 0.1
	<i>C. sphaerospermum</i> (1011)	1.9 ± 0.2
	<i>P. brevicompactum</i> (6008)	4.2 ± 0.5
	<i>P. chrysogenum</i> (3181)	7.6 ± 1.1

*: valeur moyenne de 3 répétitions

b. Spores de moisissure (N° d'inventaire IHEM)	Ergostérol (en pg/1000 spores) *	
	Milieu S10	Milieu PDA
<i>A. alternata</i> (3183)	6750 ± 1060	9350 ± 300
<i>B. aclada</i> (3129)	30 ± 0	50 ± 0
<i>B. cinerea</i> (5146)	1270 ± 100	1650 ± 130
<i>C. herbarum</i> (6005)	145 ± 8	
<i>C. sphaerospermum</i> (1011)	107 ± 25	72 ± 2
<i>P. chrysogenum</i> (3181)	50 ± 0	80 ± 0
<i>S. chartarum</i>	1450 ± 120	

*: valeur moyenne pour 3 répétitions à partir d'une suspension de spore

Le lyophilisat qui consiste en un mélange de mycélium et de spores a des teneurs en ergostérol fort variables d'une souche à l'autre, même au sein du même genre (*Cladosporium*).



Ces fluctuations pourraient s'expliquer par une variation, avec l'âge de culture avant lyophilisation, des proportions entre mycéliums et spores. Cependant, elles viennent compliquer la possibilité d'attribuer à une souche ou une espèce de moisissure donnée, une valeur en ergostérol précise. Par ailleurs, deux milieux de culture de ces moisissures ont été testés afin de mettre en évidence une éventuelle influence sur la teneur en ergostérol des spores. Les quantités d'ergostérol contenues dans l'équivalent de 1000 spores sont fort variables d'une souche à l'autre (Ex. *A. alternata* et *B. aclada*) et même au sein d'un genre. Entre *Botrytis aclada* et *Botrytis cinerea*, il y a un facteur 30 à 40, alors que les deux *Cladosporium* testés sont proches. Quelque soit le milieu de croissance, les valeurs en ergostérol restent du même ordre de grandeur. Toutefois, lors de l'obtention et de la manipulation des suspensions de spores, les sources de variation peuvent être nombreuses: le milieu (conditions de croissance), l'âge du mycélium, les prélèvements (fragments de mycélium emportés, formation d'amas de spores, hétérogénéité) et enfin les erreurs inhérentes aux comptages.

De façon à déterminer si ces différents facteurs influencent fortement le résultat final, nous avons comparé 3 cultures différentes obtenues à partir d'une même souche.

2 souches ont été testées (*C. sphaerospermum* et *P. chrysogenum*) sur les 2 mêmes milieux (PDA et S10) (Tableau 5)

Tableau 5: Teneurs en ergostérol des spores de 2 moisissures cultivées sur des milieux différents.

	Culture N°	Ergostérol (pg/1000 spores)*	
		Milieu PDA	Milieu S10
<i>C. sphaerospermum</i> (1010)	1	72 ± 2	107 ± 25
	2	95 ± 8	96 ± 31
	3	174 ± 24	113 ± 7
	moyenne	114 ± 53	105 ± 8.6
<i>P. chrysogenum</i> (3181)	1	80 ± 0	50 ± 0
	2	90 ± 9	46 ± 16
	3	96 ± 4	68 ± 8
	moyenne	88.7 ± 8.1	54.7 ± 11.7

* : valeur moyenne de 3 répétitions

A la lecture de ce tableau, et excepté pour le *C.sphaerospermum*, on constate une dispersion acceptable des valeurs obtenues pour chaque culture, ce qui conforte la fiabilité des résultats présentés au tableau précédent. Pour rappel, sur base des nombreux échantillons prélevés sur site, les analyses mycologiques réalisées à l'ISP ont démontré très fréquemment l'occurrence de fragments mycéliens en même temps que la fonge revivifiable.

La composition stérolique de trois *Cladosporium* (*C.sphaerospermum*, *C.herbarum*, *C.cladosporioides*), de deux *Penicillium* (*P. Chrysogenum*, *P. brevicompactum*), de *Fusarium solanii* et d' *Alternaria alternata* a été investiguée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Tous les profils enregistrés révèlent l'ergostérol comme constituant majeur des extraits. Bien que d'autres constituants stéroliques apparentés à l'ergostérol aient été retrouvés (déhydroergostérol, fungistérol, épistérol, déhydroergostérol, etc.), cette investigation n'a révélé aucune molécule spécifique à une espèce ou à un genre particulier.

Par contre, dès les premiers prélèvements d'échantillons d'eaux réalisés dans le cadre de l'étude d'humidificateurs de systèmes de conditionnement d'air, les analyses mycologiques ont révélé l'occurrence fréquente d'*Exophiala jeanselmei*, communément dénommé "levure noire" qui se développe préférentiellement dans les milieux liquides. Les analyses stéroliques ont révélé une molécule particulière dont les fragmentations obtenues en GCMS (Figure 7) correspondent à celles du brassicastérol ((22E)-ergosta- 5, 22 – dien – 3 β - ol).

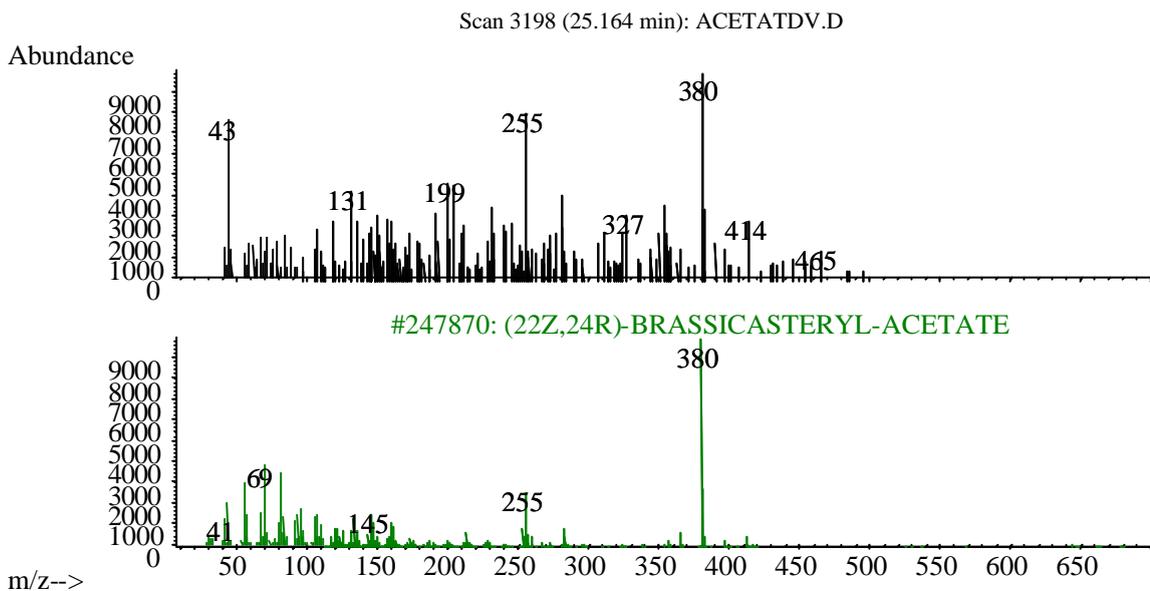
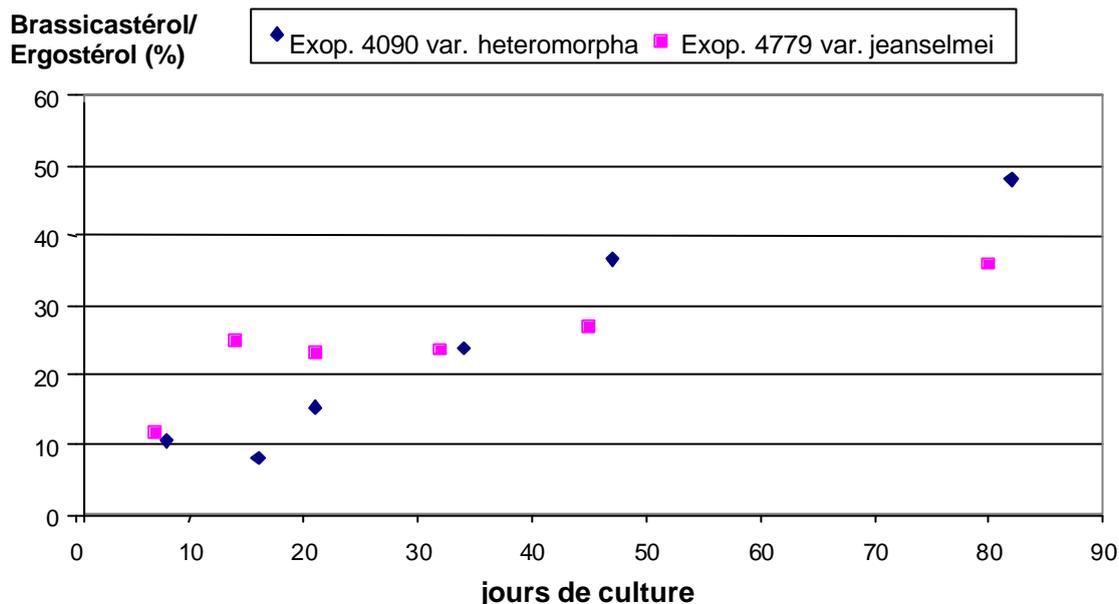


Figure 2: Fragmentations caractéristiques de l'acétate de brassicastéryle analysées par GCMS. Vue supérieure: spectre de masse enregistré au départ d'un *Exophiala jeanselmei*. Vue inférieure: Spectre de masse de référence.

Ces constatations nous ont amené à considérer le brassicastérol comme un autre marqueur fongique potentiel. Des expérimentations supplémentaires ont alors été menées sur diverses espèces fongiques isolées précédemment dans des bacs d'humidificateurs : *Acremonium strictum*, *Phialophora fastigiata*, *Phialophora malorum*, *Exophiala jeanselmei* var. *heteromorpha*, *Exophiala jeanselmei* var. *jeanselmei* et gardées en collection au sein du BCCM/IHEM Culture Collection. Elles ont été mises en culture sur milieux liquides pauvres de type S10. La biomasse a ensuite été analysée par GCMS après EAM et dérivatisation des stérols.

Sur les 6 souches testées, le brassicastérol n'est présent que chez les 2 variétés d' *Exophiala jeanselmei* ce qui devrait confirmer le "rôle d'indicateur" de cette molécule. L'influence de l'âge de la fonge sur les proportions " brassicastérol-ergostérol " a fait l'objet d'une étude connexe (Figure 3).

Figure XXX Evolution de la proportion en stérols au cours de cultures espèces d'*Exophiala* (HVAC) sur milieu S10



Les proportions en brassicastérol et en ergostérol augmentent de façon *quasi* linéaire avec le temps, surtout à partir de 14 jours de culture (coefficient de corrélation de 0.987 et de 0.971 pour respectivement *Exophiala* 4090 et 4779). Cela pourrait signifier qu'une valeur élevée de ce rapport est caractéristique de cellules fongiques âgées, voire présentant une mortalité plus importante.

La méthodologie mise au point pour le dosage de l'ergostérol à partir d'échantillons de biomasses, de spores et de prélèvements réalisés par l'ISP lors d'enquêtes sanitaires, consiste en :

- une extraction (MeOH)- saponification (NaOH) faisant intervenir les micro-ondes - EAM (Extraction assistée par micro-ondes)
 - une extraction liquide-liquide avec du cholestérol comme standard interne
 - une évaporation du solvant (n-hexane) suivie par une reprise dans du méthanol
 - une analyse par HPLC-UV avec quantification par étalonnage externe
- Si le résultat est **positif** (échantillon fortement contaminé), une confirmation est possible par dérivatisation (TMS) et analyse GC-MS.
- Si le résultat est **négatif** (échantillon peu ou pas contaminé), dérivatisation de l'ergostérol sous forme silylée (TMS), et quantification par GC-MS avec étalonnage interne (cholestérol)

Ce protocole analytique a été utilisé dans les mesures réalisées lors de toutes les enquêtes menées en partenariat par l'ISP et la FUSAGx. Il est repris sous forme détaillée dans la procédure B reprise en annexe.

En conclusion: les analyses préliminaires de biomasses fongiques, de spores, d'espèces, d'âges et de tailles différentes, ont révélé une dispersion relativement importante des teneurs en ergostérol (bio-marqueur recherché). Une hétérogénéité intervient également suite au milieu sur lequel la biomasse a été prélevée et/ou cultivée. Il est dès lors rapidement apparu qu'il était préférable d'établir des valeurs guide à la fois au niveau microbiologique et biochimique car des corrélations nettes ne peuvent pas être mises en évidence. Les valeurs guide seront définies de manière essentiellement complémentaire.

Le diagnostic final par une approche "multi-méthode" qui confronte des observations diversifiées se trouvera renforcé.

IV.1.2. Les Composés Volatils d'Origine Microbienne (MVOCS)

Les MVOCs (Microbial Volatiles Organic Compounds) trouvés dans un local peuvent être utilisés comme indicateurs d'une contamination fongique. Cependant, la détection de métabolites secondaires volatils dans l'air ambiant représente un réel défi pour l'analyste:

- sauf en cas de bio-contamination très intense, les teneurs en molécules volatiles sont toujours très faibles et, le plus souvent, elles appartiennent à des classes chimiques variées. Néanmoins, certains types moléculaires ont été associés à des souches particulières (ex: le 2-ethyl-hexanol chez *Aspergillus versicolor*).

- les métabolites fongiques volatils sont échantillonnés en même temps que les autres produits chimiques relargués notamment par les matériaux, les couleurs et vernis, les enduits divers et bien sûr les activités humaines.

- il est par ailleurs vraisemblable que la biosynthèse par les moisissures de divers métabolites dépendent des conditions édaphiques et environnementales.

- l'hétérogénéité spatio-temporelle des lieux de prélèvement est aussi une source de variabilité. En effet, l'analyse d'air prélevé au niveau du sol peut révéler des différences très significatives par rapport à des échantillonnages réalisés à hauteur d'homme.

- les résultats sont potentiellement influencés par la méthodologie d'échantillonnage mise en œuvre. Un échantillonnage dynamique par piégeage des volatils sur des cartouches d'adsorbants conduit à des résultats divergents mais complémentaires à ceux qui peuvent être enregistrés suite à des sorptions simples (échantillonnage passif).

- l'occurrence de substances spécifiques à divers genres et/ou espèces permet d'affiner le diagnostic en matière de contamination car elles peuvent indiquer la présence de moisissures sans que celles-ci ne soient visibles (développement d'une biomasse cachée).

Avant de passer aux enquêtes sur le terrain, il a été convenu d'étudier la production de MVOCs par diverses moisissures. Les équipes de la FUSAGx et de l'ISP ont procédé à de nombreuses séries d'essais afin d'étudier les volatils libérés selon les milieux de culture, de mettre au point une technique de culture en laboratoire qui reflète au mieux les conditions rencontrées en pollution intérieure et aussi d'investiguer les cinétiques de production, c'est-à-dire l'évolution du relargage de MVOCs par une souche déterminée au cours du temps. En effet, l'âge d'une moisissure a de l'importance sur son métabolisme et de là, sur ses possibilités biosynthétiques.

A des fins de mise au point, un essai préparatoire a été mené sur *Aspergillus versicolor* (N° IHEM 6898 et 2157), moisissure fréquemment rencontrée en milieu indoor. L'échantillonnage a été réalisé par SPME (Solid phase Microextraction : sorption des MVOCs de l'espace de tête sur

une fibre rétractile montée sur une aiguille de seringue chromatographique). Cette technique a été choisie pour sa facilité de mise en œuvre.

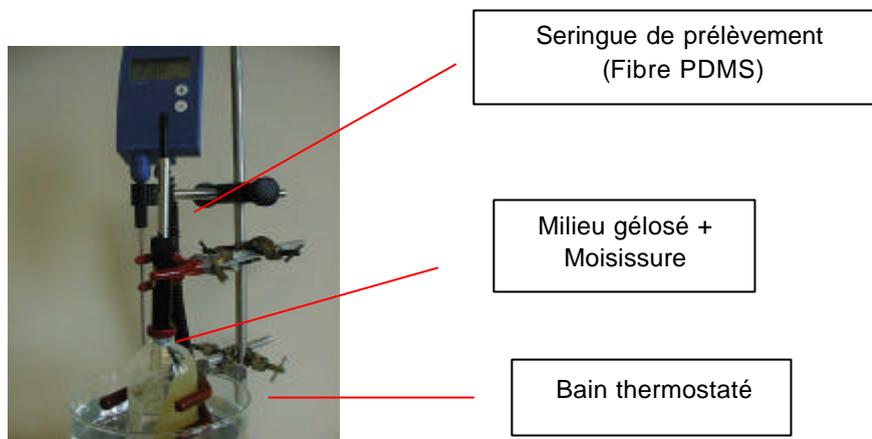


Tableau 6: Profils en MVOCs de deux souches d'*Aspergillus versicolor* cultivés dans des conditions rigoureusement semblables: soit en flacon obturé par une bourre de cellulose classique FH (croissance rapide des mycélija) permettant l'entrée d'air soit en présence d'un septum et d'un filtre 0.2 µm (croissance lente).

Molécule	Temps réten (en min)	A. versicolor 6898		A. versicolor 2157	
		FH	SF	FH	SF
2-hexanone	6.4			x	
1-octen-3-ol	6.8	xx	x		
5-methyl-3-heptanone	7		x		
2-ethyl-1-hexanol	7.6			x	
limonene	7.7	xx		x	
2-ethyl hexanoic acid, methyl ester	7.9			x	
1.8-cineole	7.9		x		x
1.3- dimethoxybenzene	9.9	x	x	x	x
pulegone	10.2			xx	xx
g- muurolene	13.7			xxxx	
g- curcumene	14.3			xxxx	
farnesene	14.5	xxx			
b- himachalene	14.7			xx	
a- chamigrene	14.8			xx	
longipinene	15.2			x	
b-sesquiphellandrene	15.4			xxxx	

Les profils enregistrés divergent selon la souche et le mode de modalité de culture. Il est manifeste que les 2 souches étudiées présentent des profils en volatils fort différents; la souche 2157 produisant une large gamme de composés terpéniques, la seconde libérant principalement du farnesène. Compte tenu de cette observation il a été convenu de tester un nombre suffisant de souches d'une même espèce avant de faire le bilan en volatils produits par cette espèce. A cette fin de nombreuses souches de genres et d'espèces variées ont été analysées selon des protocoles expérimentaux rigoureusement suivis au cours d'études menées en parallèle avec le projet (voir encadrés I et II ci-dessous).

ENCADRE I

® Etude des MVOCs libérés par diverses souches mycéliennes fréquemment identifiées dans les environnements intérieurs. Suivi cinétique des productions de MVOCs sur milieux gélosés .

- *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Acremonium pteridii*, *Acremonium strictum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium restrictum*, *Phialophora fastigiata*, *Phialophora malorum* produisent tous des hydrocarbures sesquiterpéniques non spécifiques en quantités variables selon les espèces. Des molécules oxygénées en C8 (1-octène-3-ol, 3-octanone) ont aussi été mises en évidence chez certaines souches mais sans pouvoir prétendre à être suffisamment spécifiques que pour être utilisées comme bio-indicateurs.
- *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor* et *Penicillium aurantiogriseum* reconnues dans la littérature comme étant impliquées dans de nombreux problèmes de contamination de bâtiments sont, parmi les souches étudiées, celles qui produisent les quantités les plus importantes de MVOCs.
- La cinétique d'émission des MVOCs suit une évolution semblable à celle d'une croissance microbienne) en 3 phases : une phase de production croissante , une phase stationnaire puis une phase de déclin. Le taux maximum de production de MVOCs est dépendant du type de souche et se situe entre 2 et 34 jours!
- Dans les conditions de l'étude, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium crustosum* et *phoma limeti* ne libèrent aucun MVOC.

ENCADRE II

® Etude des MVOCs libérés par 37 souches du genre *Trichoderma*

- 3 types de souches selon qu'elles produisent 1 métabolite majoritaire très spécifique / de nombreux métabolites (principalement des hydrocarbures sesquiterpéniques très diversifiés) / de très faibles quantités de MVOCs
- Analyse en composante principale des profils : établissement d'une filiation chimiotaxonomique performante qui vient en appui des identifications mycologiques classiques
- HS-SPME - GCMS characterization of volatile secondary products from 37 *Trichoderma* strains. Delvigne F., Verscheure M., Palm R., Gofflot S., Beguin H., Nolard N., Marlier M., Lognay G. 8th International Symposium on Hyphenated techniques in Chromatography and hyphenated chromatographic analysers, Brugge, February 4-6 (2004).

® Etude des MVOCs libérés par 86 souches de dermatophytes

- très grande hétérogénéité des profils en MVOCs
- mise en évidence de molécules oxygénées, de produits soufrés et d'hydrocarbures sesquiterpéniques pour seulement quelques souches.
- Possibilité réduite de discrimination entre souches.
- Evaluation of volatile metabolites as a taxonomic tool for identification of dermatophytes Verscheure M., Gofflot S., Beguin H., Marlier M., Belot J.L., Nolard N., Lognay G. *Mycoses*, 45, 67 (2002)

Il ressort de ces divers tests qu'il est difficile d'attribuer un type moléculaire à une espèce donnée et ce, même en conditions de cultures contrôlées et reproductibles sur milieu gélosé. Néanmoins, dans le but de rencontrer un objectif du programme, des mises en culture sur substrat réel ont été effectuées dans des conditions contrôlées qui "reproduisent" au mieux un environnement contaminé (T°, Humidité relative de l'air) (papier peint, plâtre, isolant, matériaux de gaines de ventilation, etc.) avant de passer aux prélèvements sur sites (Figure 4).

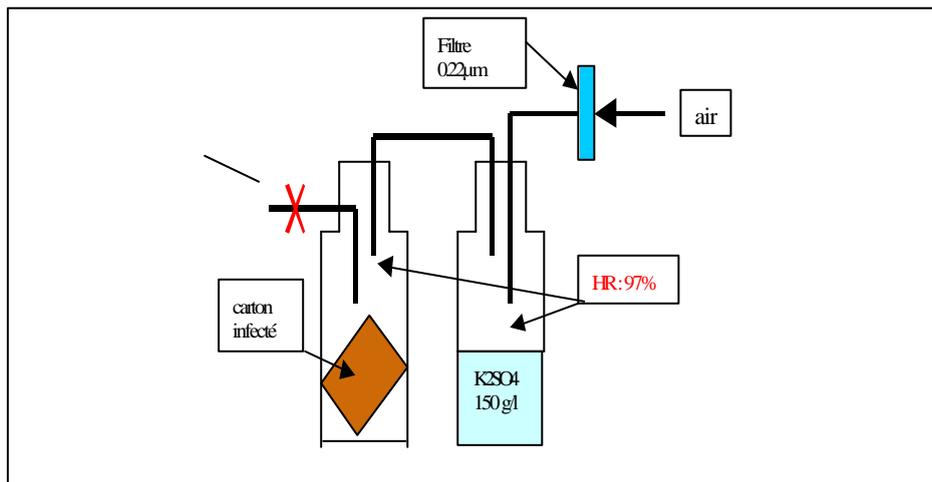


Figure 4: Dispositif de laboratoire pour la culture contrôlée d'*Aspergillus versicolor* N°1129 sur plaque de plâtre et pour le prélèvement des MVOCs

Deux types de prélèvements de MVOCs ont été effectués après 3 mois de culture :

→prélèvement par SPME (Fibre carboxène-PDMS- durée 30 et 120 min t)

→prélèvement par aspiration d'air dans l'enceinte, et passage sur cartouche " ASSET " qui a la propriété d'adsorber les molécules volatiles. Après pompage, ces dernières sont ensuite désorbées à l'aide d'un volume minimum de solvant, puis injectées en GC-MS.

Tableau 7 MVOCs libérés par *Aspergillus versicolor*.

<i>Aspergillus versicolor</i>	Molécule	Temps de Réten. (min)	Type de prélèvement		
			Cartouche ASSET	SPME carbox 30 min.	SPME carbox 120 min.
	4-methyl-2-pentanone	4.6	X		
	2-ethyl-1-hexanol	10.6	X		
	2-ethyl hexanoic acid, methyl ester	12.8		X	
	Camphor	12.9	X	X	
	1.3-dimethoxy benzene	13.3	X	X	X
	2.6 di-T-butyl-4-OH- 4-methyl -2.5 cyclohexadien-1-one	18.5	X		
	2.6 di-T-butyl -2.5 cyclohexadien-1.4 dione	18.6	X		
	2.6 di-T-butyl-4 methylene - 2.5 cyclohexadien-1.4 dione	18.7	X		
	g- selinene	19.0			X

Les résultats colligés au Tableau 7 mettent clairement en évidence que le profil en volatils varie selon la technique d'échantillonnage utilisée, ce qui est tout à fait normal. Les principes "guidant" la rétention des MVOCs étant essentiellement différents: dans le cas du piégeage sur colonne ASSET, il s'agit d'une adsorption tandis que dans le cadre de la SPME, il s'agit présentement d'une interaction mixte: sorption-adsorption. Toutefois, et bien que la souche testée soit différente des 2 souches testées sur milieu gélosé, certaines molécules se retrouvent: Il s'agit du 1,3- diméthoxybenzène (commun pour les 3 souches), du 2-éthyl-1-hexanol et de l'ester méthylique de l'acide 2éthylhexanoïque (présents chez 2 souches). Le même dispositif a été utilisé pour étudier *Aspergillus niger*. Dans ce cas le 2-éthyl-1-hexanol a été décelé comme constituant majoritaire accompagné par du 1-octène-3-ol. (Piégeage sur colonne ASSET).

En conclusion: les développements expérimentaux relatifs aux analyses de MVOCs rapportés ci-dessus mettent en évidence les difficultés liées à l'investigation de ce type de bio-marqueurs, difficiles à échantillonner et variables selon les substrats ou les milieux de culture et les souches. En conditions réelles, deux autres facteurs s'ajoutent à ceux qui ont été relevés: l'occurrence simultanée de plusieurs espèces fongiques à des stades de développement très hétérogènes et la présence de "cocktails" moléculaires très variés de substances volatiles qui ne sont pas d'origine fongique. Il ressort néanmoins que la détection de 2-éthyl-1-hexanol confirme la présence d'*Aspergillus fumigatus* fréquemment rencontrée dans les milieux pollués.

IV.1.3. Les β -(1 \rightarrow 3)-D-GLUCANS

Des essais préliminaires (réalisés sur de l'eau et sur de l'air) sur base de la méthode chromogénique (Kit de dosage LAL) se sont systématiquement révélés non épétables, peu sensibles. La mise en œuvre des dosages, extrêmement délicate, nécessite un personnel expérimenté et l'usage de précautions analytiques draconiennes. En effet, il n'est pas rare d'avoir des résultats supérieurs dans les blancs par rapport aux échantillons, cela étant vraisemblablement dû à l'occurrence d'interférences dont il est difficile de se défaire. Par ailleurs, le test manque de spécificité par rapport aux objectifs fixés. Dès lors, d'un commun accord entre les partenaires de la recherche et les experts membre du comité de suivi, cette approche analytique a été abandonnée.

IV.2. MESURES SUR SITES

IV.2.1. Les immeubles à bureaux

IV.2.1.1. Les humidificateurs

Les humidificateurs utilisés dans les systèmes de conditionnement d'air constituent des milieux privilégiés pour l'amplification d'une biomasse spécifique. La propagation de micro-organismes et de leurs débris dans le milieu de travail peut constituer un facteur de désagrément. Compte tenu de la spécificité de cette microflore aquatique, l'immunité acquise n'est pas spécifiquement adaptée à ce type potentiel d'agression.

Rappel

A la base des recherches microbiologiques, plusieurs données de références avaient été obtenues au cours des programmes précédents. Elles sont résumées dans l'encadré ci-dessous.

- **Fonge mésophile (hygrophile): 10 CFU/ml (Mais tenir compte du mélange d'espèces, et exclure les espèces dangereuses)**
- **Bactéries totales à 25°C: 50 000 CFU/ml**
- **Bactéries totales à 37°C: 10 000 CFU/ml**
- ***Thermoactinomyces* à 52°C: < 10 CFU/ml (et exclure *T. vulgaris*)**
- **pH: 7 à 9**
- **Conductivité: < 1 500 µS**

Etude microbiologique de 451 humidificateurs

L'importance de la microflore aquatique a été systématiquement mise en évidence. Il est bon de rappeler que certains genres n'appartenant pas à cette microflore particulière ont été décelés mais qu'ils sont à considérer comme provenant de sources de contaminations différentes.

Les valeurs guide présentées ci-dessous intègrent l'ensemble des analyses réalisées à l'ISP, non seulement dans le cadre du projet, mais aussi dans le cadre d'enquêtes faisant partie des activités de la Section Mycologie.

Le pH et la conductivité

En ce qui concerne les mesures de conductivité, plus de 75 % des échantillons examinés se situaient en-dessous des 1500 µS/cm conseillés avec, cependant, des maximum enregistrés particulièrement exceptionnels (10500 µS/cm). Certains pH étaient également dans certains cas particulièrement élevés (10.8).

Tableau 8

Eau humidificateur - Conductivité	
Centiles	µS/cm
5	85
25	620
50	824
75	1135
95	2470
en µS/cm	
n = 421 données	
Moyenne	1068
Ecart type	1233
Min	15
Max	10500

Tableau 9

Eau humidificateur - pH	
	unité pH
Moyenne	8,35
Ecart type	1,06
Min :	4,25
Max :	10,77
n = 421 données	

Les bactéries

Par rapport aux valeurs médianes obtenues au cours du premier programme PSF, on enregistre une diminution de la contamination bactérienne. Si on se réfère au centile 50, pour les bactéries incubées à 25°C, on passe de 50 000 à 23 000 CFU/ml, et pour les bactéries incubées à 37°C, la diminution est nettement plus prononcée, de 10.000 à 600 CFU/ml (maximum). On peut certainement expliquer ces diminutions par les actions préventives et correctives menées ces dernières années.

- surveillance de la qualité microbiologique de l'eau, mesures correctives régulières (biocides, déconcentration, etc.) ce qui influe particulièrement sur la concentration en bactéries "environnementales" se développant à 25°C maximum
- augmentation de la proportion d'air frais extérieur quand il y a récupération d'une partie de l'air intérieur, ce qui influe particulièrement sur la concentration en bactéries d'origine "humaine" se développant à 37°C.

Tableau 10

Eau humidificateur - Bactéries à 25° C		
Centile	Valeurs calculées	Valeurs arrondies
5	110	100
25	3.700	5.000
50	23.000	25.000
75	165.500	200.000
95	1.887.000	2.000.000
En CFU/ml		
n = 435 données		
Max = 10 210 000 CFU/ml		

Tableau 11

Eau humidificateur - Bactéries à 37° C		
Centile	Valeurs calculées	Valeurs arrondies
5	0	0
25	63	50
50	600	500
75	8.825	10.000
95	590.000	500.000
En CFU/ml		
n = 442 données		
Max = 4 830 000 CFU/ml		

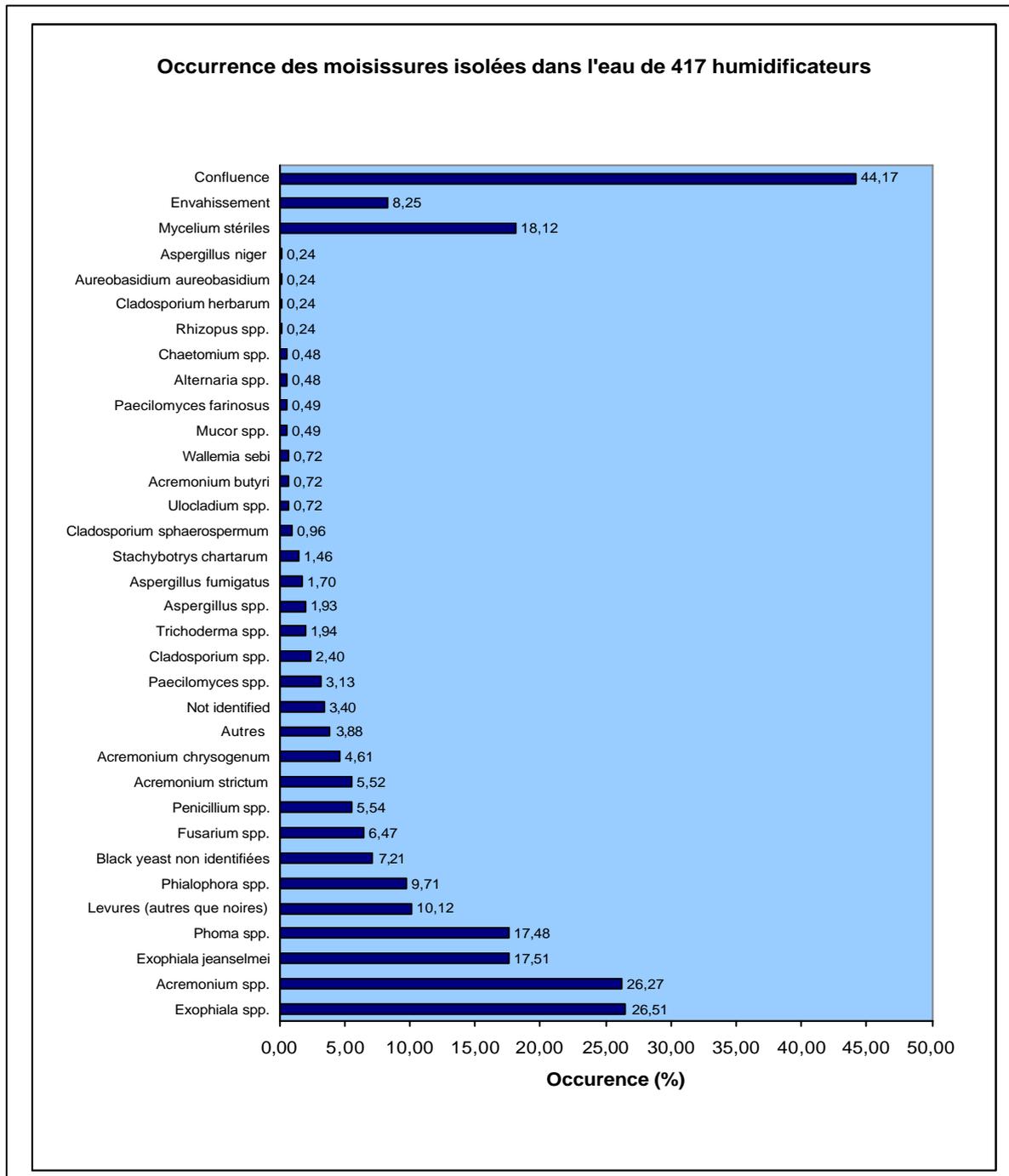
Les moisissures

Nous constatons que la valeur médiane reste la même (10 CFU/ml) que celle obtenue au cours des travaux antérieurs. Nous insisterons cependant sur une notion particulièrement importante, à savoir que cette valeur, et celles présentées dans le tableau 12 ci-dessous ne concernent que les moisissures se développant dans les milieux liquides. Il est donc indispensable au cours d'un dénombrement d'identifier les différents taxons, au minimum au genre, afin de distinguer les espèces se développant dans les milieux liquides des autres. Ces espèces sont à même de s'amplifier dans l'humidificateur. Cette valeur limite de 10 CFU/ml doit également être nuancée en fonction de la spécificité des moisissures isolées.

Tableau 12

Eau humidificateur - moisissures des milieux liquides à 25° C		
Centile	Valeurs calculées	Valeurs arrondies
5	0	
25	2	
50	11	10
75	63	50
95	548	500
En CFU/ml		
n = 451 données		
Max = 14.500 CFU/ml		

Le tableau ci-dessous reprend les moisissures les plus fréquemment rencontrées dans l'eau des humidificateurs en Belgique. Les "Black yeasts", comprenant *Exophiala jeanselmei* et *Phialophora spp.* dominant largement ainsi que les genres *Acremonium spp.* et *Phoma spp.* Et, dans une moindre mesure, le genre *Fusarium spp.*



L'ATP

Au départ, le dosage de l'ATP était réalisé dans le but de confirmer les résultats concernant les germes revivifiables, particulièrement lorsque les résultats étaient peu élevés ou négatifs. En effet, l'emploi récent de biocide avant les prélèvements d'échantillons, par exemple, supprime toute vie mais la plupart des biocides n'éliminent pas l'ATP. Rappelons en effet que l'ATP, en tant que molécule énergétique de base utilisée par tous les êtres vivants peut-être utilisée comme bio-marqueur lié à l'occurrence de matériel biochimique issu d'organismes vivants mais aussi morts.

Toutefois, avec l'accumulation des résultats, une échelle constituée par des valeurs centiles a été calculée (tableau 14). Des valeurs supérieures à 700 unités de luminescence indiquent généralement une contamination microbiologique.

Tableau 14

Eau humidificateur - ATP		
Centile	Valeurs calculées	Valeurs arrondies
5	18	20
25	250	250
50	680	700
75	2.300	2.500
95	9.000	10.000
En unités de luminescence		
n = 271 données		
Max = 64000 unités de luminescence		

L'ergostérol dans l'eau et dans les dépôts

De façon à être la plus représentative possible, l'investigation a porté sur des humidificateurs situés dans des bâtiments différents fonctionnant selon différents modes d'humidification, et entretenus par des sociétés de maintenance diverses. Ces dernières utilisent leur propre protocole de maintenance, avec des fréquences d'entretien différentes, et ont parfois recours à des agents biocides variés.

Les analyses citées ci-dessus sont entreprises durant trois ans ont été réparties selon les saisons de chauffe annuelles qui débutent en général à partir de la deuxième semaine du mois d'octobre et finissent vers la fin du mois de mars.

Durant trois saisons de chauffe, s'étalant sur trois années successives, 162 groupes ont été investigués (162 eaux et seulement 148 dépôts (certains groupes ne contenaient pas de dépôts)).

Le nombre de cas où il a été détecté de l'ergostérol (cas positifs) est calculé sous forme de pourcentage et l'évolution des nombres de cas positifs selon les saisons est représentée à la figure 5.

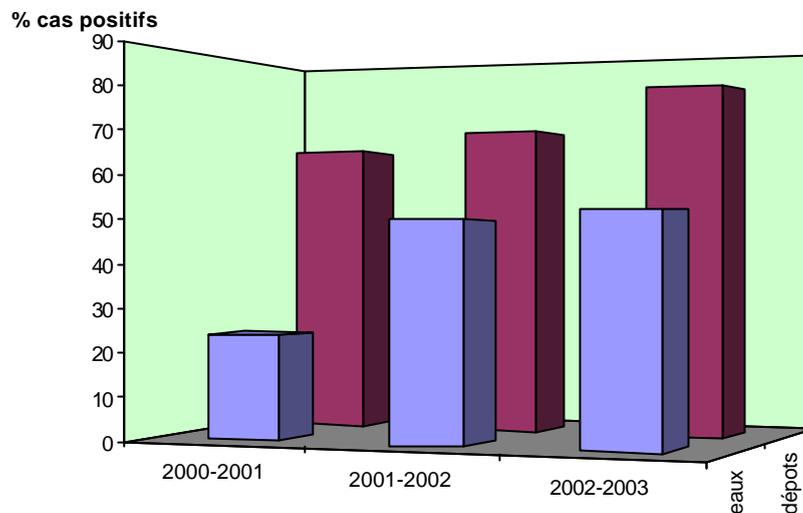


Figure 5: évolution des cas positifs des humidificateurs étudiés au cours de trois saisons de chauffe successives.

A l'examen des résultats obtenus, il ressort que les concentrations en ergostérol dans les eaux sont de l'ordre du ppb et, dans les dépôts, de l'ordre du ppm.

Les quantités d'ergostérol mesurées dans les dépôts au cours de la saison 2002-2003 sont relativement plus élevées que celles mesurées durant les deux autres saisons et le pic enregistré est de 15 µg/g M.S (saison 2002-2003, deuxième partie de chauffe) pour un groupe de type pulvérisateur. Les groupes ayant le système d'humidification dit de type "Pulvérisateur" présentent en général des quantités d'ergostérol enregistrées plus élevées par rapport aux groupes dits de type "Amazone". Ces résultats sont vraisemblablement dus aux différences de conception des deux types d'humidificateurs.

Les valeurs d'ergostérol enregistrées sont en général plus élevées de janvier à mars pour les trois années. C'est également la période pendant laquelle on observe les fluctuations les plus élevées. Nous avons constaté que les entretiens des bacs des humidificateurs étaient souvent effectués moins régulièrement vers la fin des saisons de chauffe.

Les diverses campagnes ont permis de définir des valeurs centiles reprises dans les tableaux ci-dessous qui montrent une cohérence et une définition de plus en plus précise en fonction des effectifs d'analyses.

Tableau 15

Centiles	Ergostérol Dépôts µg/g		
	Saisons 2000 à 2001	Saisons 2000 à 2002	Saisons 2000 à 2003
	Effectif : 33	Effectif : 64	Effectif : 148
25	-	-	-
50	0.5	0.8	0.9
75	3	3	3
90	5	5	5.5

Tableau 15: centiles calculés pour les dépôts

Tableau 16

Centiles	Ergostérol Eau ng/l		
	Saisons 2000 à 2001	Saisons 2000 à 2002	Saisons 2000 à 2003
	Effectif : 33	Effectif : 61	Effectif : 162
25	-	-	-
50	-	-	-
75	<10	30 < E > 70	30 < E > 90
90	38 < E > 85	145 < E > 250	150 < E > 490

Tableau 16: centiles calculés pour les eaux

Les teneurs en ergostérol correspondant aux centiles établis d'une saison à l'autre sont bien confirmés si l'on intègre la totalité des échantillons (n = 162). Ceci est surtout valable pour les dépôts. Une échelle provisoire "de propreté" (tableau 17) est constituée sur base des centiles 50, 75 et 90, calculés pour les dépôts. A l'avenir ces valeurs seront confirmées sur base d'un échantillonnage plus important.

Cette échelle, peut constituer un outil d'aide à la décision très intéressant pour les responsables de la maintenance quant aux attitudes à prendre pour les mesures préventives ou correctives.

Tableau 17: proposition d'un outil d'aide à la décision en cas de contaminations microbiologiques de l'eau d'un humidificateur	
entre 0 et 75	Etat jugé satisfaisant sur le plan fongique
entre 75 et 90	A surveiller; reprise d'un échantillon 15j après une opération de maintenance
supérieur à 90	Identifier et solutionner le problème 15j après une opération de maintenance

Le brassicastérol

Comme signalé ci-dessus, les levures noires appartenant aux genres *Exophiala sp.* et *Phialophora sp.* sont parmi les plus fréquentes dans les humidificateurs. Une analyse approfondie des stérols constitutifs a dès lors été entreprise sur 12 souches de cette espèce provenant de la collection de l'ISP (BCCM) en vue de rechercher un traceur spécifique de celle-ci. En effet, il s'avère particulièrement intéressant de pouvoir la détecter relativement rapidement et l'identifier. Les méthodes microbiologiques classiques nécessitent plus de 15 jours d'incubation pour avoir une culture aisément observable pour *Exophiala jeanselmei*. Rappelons que les éléments taxonomiques actuels restent encore fort larges pour discriminer ces 2 genres.

Dans tous les cas, une molécule dénommée brassicastérol a été détectée. Son occurrence a été confirmée par une série d'investigations spectrométriques (HPLC-MS et GCMS) qui ont conduit à son identification certaine. En effet, les spectres de masse enregistrés en GCMS correspondent aux hypothèses de structure qui ont été récemment confirmées par HPLC-MS (Figure 6 et 7). L'ergostérol ($m/z = 379$) est parfaitement distingué du brassicastérol ($m/z = 381$).

Il faut préciser qu'en parallèle, l'analyse des stérols issus de diverses moisissures appartenant aux genres *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, et *Alternaria* n'ont pas révélé de brassicastérol.

En conclusion, la mesure des teneurs en ergostérol est un outil "quantitatif" permettant d'évaluer la qualité microbiologique des eaux d'humidificateur. D'autre part, la détection de brassicastérol dans les extraits rend compte de l'occurrence d'*Exophiala* et de *Phialophora*.

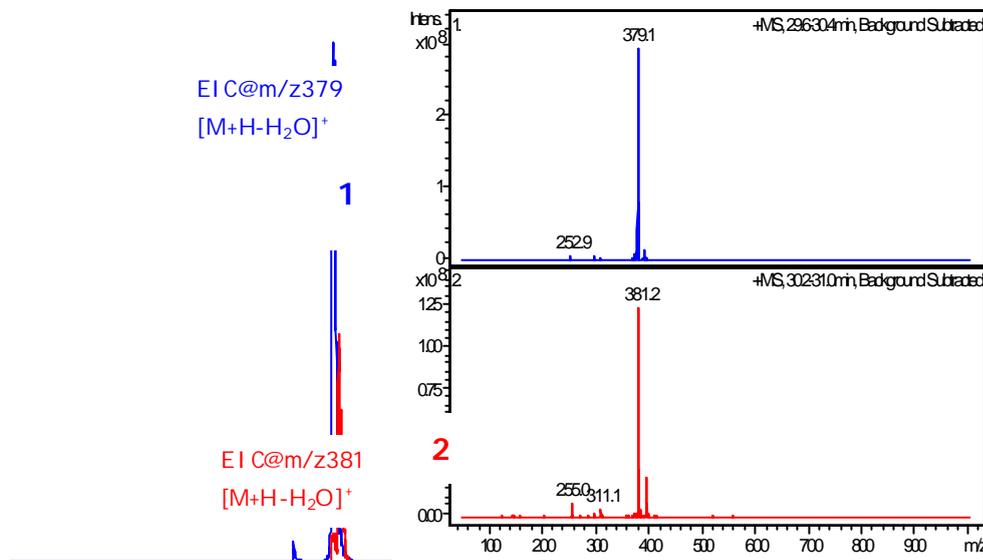


Figure 6: EIC (m/z 379) et EIC (m/z 381) en mode APCI (+)

Figure 7: spectres de masse correspondant aux pics 1 et 2

Les endotoxines dans l'eau des bacs des humidificateurs

Quarante eaux d'humidificateurs ont été analysées selon la méthode chromogénique LAL cinétique. Le traitement des résultats obtenus a conduit à l'établissement des valeurs centiles colligées au tableau 18.

Tableau 18

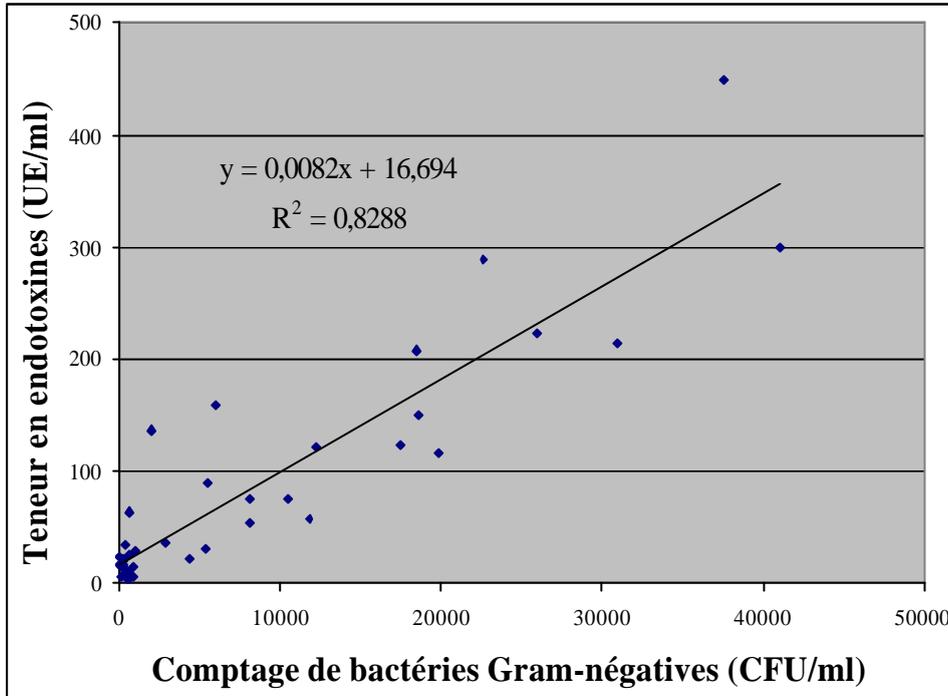
Eau humidificateur - Endotoxines		
Centile	Valeurs calculées	Valeurs arrondies retenues
25	18	
50	46	50
60	75	
70	107	100
75	146	
90	298	
95	549	>500
En unités UE/ml (Unités d'Endotoxines par ml) 10 UE/ml = 1 ng/m		
n = 43 données		
Max = 2.005 UE/ml		

Tableau 19

Tableau x : proposition d'un outil d'aide à la décision en fonction de la concentration en endotoxines mesurées dans l'eau d'un humidificateur	
<50 UE/ml	Etat jugé satisfaisant
>50 et <100 EU/ml	A surveiller; reprise d'un échantillon 15j après une opération de maintenance
>100 et <500 UE/ml	Mesures correctives à prendre rapidement; reprise d'un échantillon 15j après une opération de maintenance
>500 UE/ml	Mesures correctives immédiates

Les comptages de bactéries Gram- (en CFU/ml) et les teneurs en endotoxines respectives (en UE/ml) des 43 eaux étudiées sont mis en relation à la figure 8: une "corrélation" ou plutôt une tendance linéaire ($R^2 = 0,8288$) est observée.

Figure 8



Effet de la réfrigération des eaux sur leur teneur en endotoxines

L'évolution des teneurs en endotoxines de 8 eaux réfrigérées a été entreprise.

Pour chacune de ces eaux, le dosage des endotoxines par la méthode LAL chromogénique, basée sur le temps de réaction pour atteindre une densité optique de 0,3, a été effectué de manière similaire après un week-end, une semaine, deux semaines, trois semaines et un mois de réfrigération.

Les résultats obtenus sont repris sous forme de graphique à la figure 9.

De manière générale, on observe, au cours du temps, un accroissement assez significatif de la teneur en endotoxines (UE/ml) des eaux.

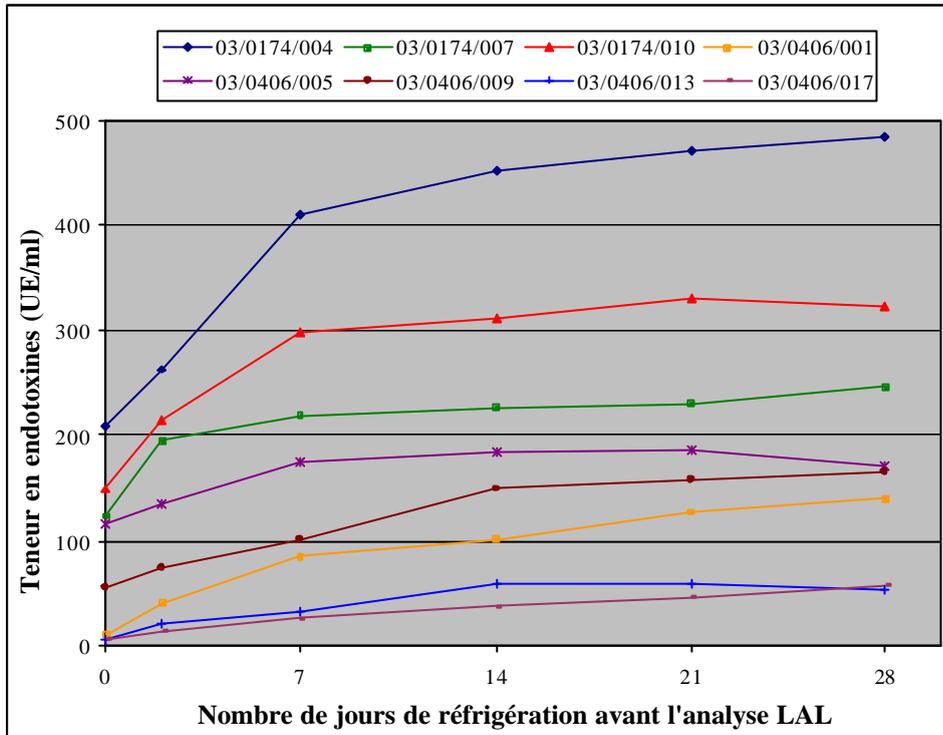
Cette tendance se marque principalement au terme de la première semaine de réfrigération où les teneurs en endotoxines retrouvées peuvent déjà être augmentées d'un facteur 8 par rapport aux teneurs initiales.

Au cours des trois semaines restantes, on observe que les teneurs en endotoxines finissent par atteindre un palier, sans doute du à l'effet de la réfrigération qui ralentit la croissance des bactéries Gram- présentes dans les eaux.

Au terme de l'analyse (c'est-à-dire après un mois de réfrigération), il apparaît que les teneurs en endotoxines des eaux dépassent de 1,5 à 14 fois celles de départ.

Comme on le voit, ce coefficient multiplicatif variant très fortement d'un échantillon à l'autre. Cela contraint à conclure que le dosage des endotoxines dans les eaux par la méthode LAL ne fournit des valeurs correctes que s'il est réalisé le plus tôt possible après prélèvement (et dans le cas bien sûr où une congélation n'est pas envisagée).

Figure 9



Effet de la congélation des eaux sur la teneur en endotoxines

Les mêmes eaux qu'au paragraphe précédent ont servi à tester, d'une manière générale, l'effet de la congélation des eaux d'humidificateurs (température : - 20°C) sur leur teneur en endotoxines (UE/ml), mesurée à nouveau par la méthode cinétique du test LAL.

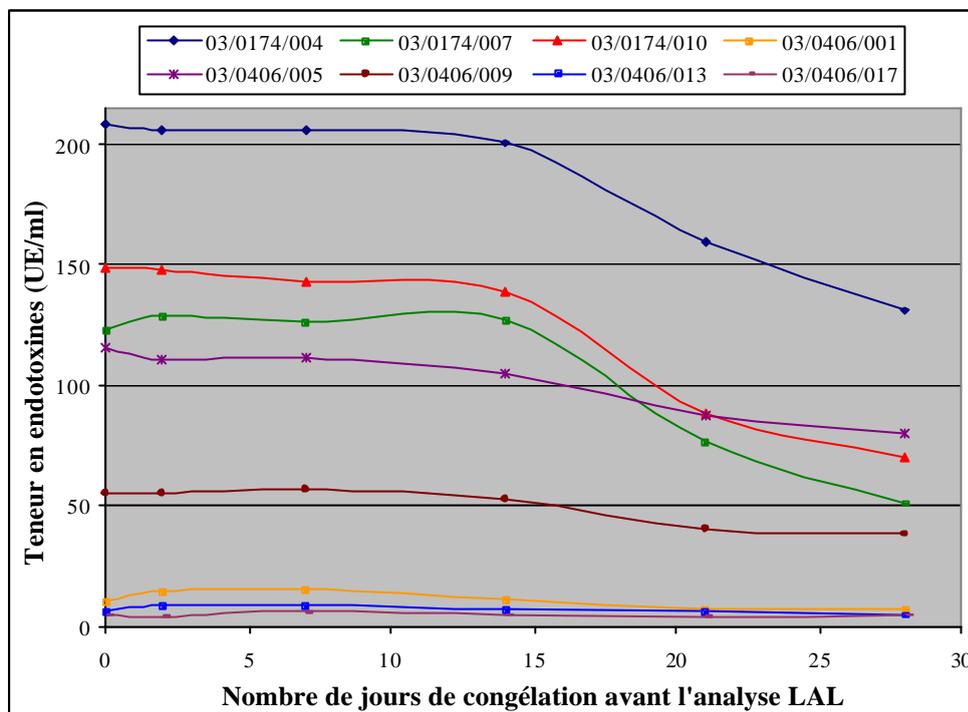
Les dosages d'endotoxines sont de nouveau réalisés après un week-end, une semaine, deux semaines, trois semaines et un mois de congélation.

Les résultats sont repris sur le graphique de la figure 10.

L'élément primordial à mettre en évidence concerne la constance remarquable des teneurs en endotoxines des eaux au cours des deux premières semaines de congélation. Sur la figure 34, ce fait se marque clairement pour l'ensemble des eaux étudiées, par les plateaux observés jusqu'à deux semaines.

La période qui a suivi révèle (par contre) une diminution assez nette des teneurs en endotoxines retrouvées. La perte maximum observée est de 59 % (par rapport à la teneur initiale).

Figure 10



IV.2.1.2. L'air dans les bureaux

Les bactéries

Nous avons calculé, pour les bactéries de l'air, plusieurs centiles à partir des résultats obtenus au cours de 166 enquêtes microbiologiques réalisées dans des bâtiments équipés de centrales de conditionnement d'air. Exprimés en CFU/m³, ces centiles donnent une échelle permettant de situer le niveau de contamination en bactéries d'un bâtiment par rapport aux 166 bâtiments similaires étudiés. Ces valeurs ne sont cependant pas corrélées avec des problèmes de santé.

Tableau 20

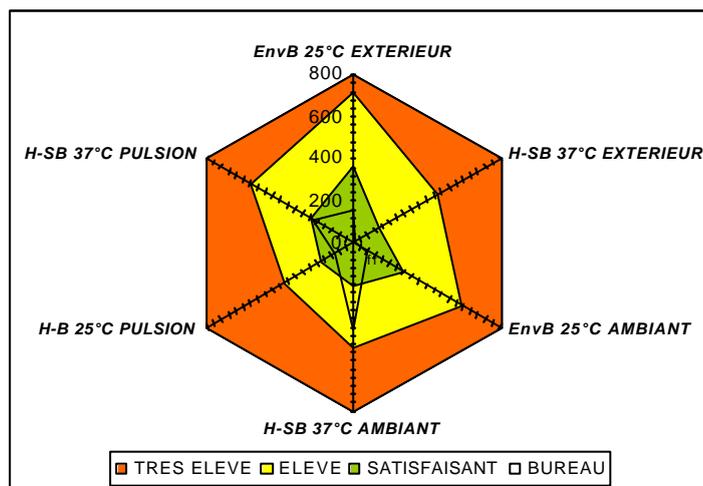
Centiles	Extérieur	Extérieur	Intérieur	Intérieur	Intérieur	Intérieur
	EB,25°C	HSB,37°C	Ambiant	Ambiant	Pulsion	Pulsion
	EB,25°C	HSB,37°C	EB,25°C	HSB,37°C	EB,25°C	HSB,37°C
5	50	0	25	13	0	0
25	100	25	75	63	38	25
50	213	63	150	125	100	75
75	363	138	275	238	175	138
95	713	450	588	550	375	338
n	122	126	809	812	223	223
Max.	2738	1525	2525	1850	1126	913

EnvB: Mesophilic Environmental Bacteria; H-SB: Mesophilic Human-Source Bacteria

Pour faciliter l'interprétation des résultats, une représentation graphique est utilisée. Trois niveaux de qualité bactériologique, en fonction des centiles calculés sont délimités en arrière plan du graphique pour servir de références: SATISFAISANT (en-dessous du centile 75), ELEVE (entre les centiles 75 et 95) et TRES ELEVE (au-dessus du centile 95). Les résultats sont reportés sur 6 axes correspondant aux bactéries H-SB et EnvB isolées aux 3 endroits stratégiques, l'extérieur, la pulsion et l'air ambiant.

Il est important de préciser que ces niveaux de qualité ne sont pas corrélés avec un niveau de risque pour la santé. Toutefois le principe de précaution peut être appliqué en cas de contaminations élevées.

Figure 10



Dans l'exemple représenté sur le graphique, la charge en H-SB dans l'air ambiant est élevée à la pulsion alors qu'au niveau de la pulsion dans le bureau et à l'extérieur, les résultats indiquent une charge satisfaisante. On peut conclure à un environnement "surpeuplé" et/ou à une ventilation insuffisante.

Les moisissures de l'air

Nous avons calculé, pour les moisissures de l'air, plusieurs centiles à partir des résultats obtenus au cours de 166 enquêtes microbiologiques réalisées dans des bâtiments équipés de centrales de conditionnement d'air. Exprimés en CFU/m³, ces centiles donnent une échelle permettant de situer le niveau de contamination en moisissures d'un bâtiment par rapport aux 166 bâtiments similaires étudiés. Ces valeurs ne sont cependant pas corrélées avec des problèmes de santé.

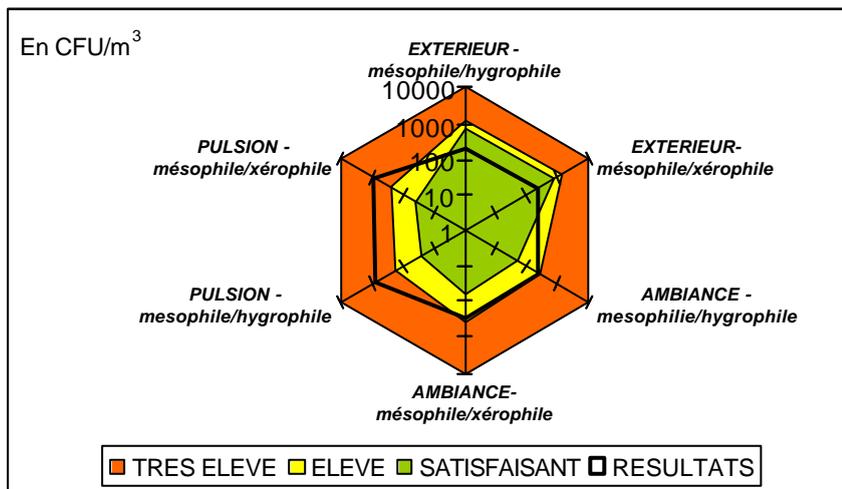
Tableau 21

Centiles	Air ambiant		Air pulsé		Air extérieur*	
	HS	DG18	HS	DG18	HS	DG18
5	<13	<13	<13	<13	(38)	(88)
25	<13	<13	<13	<13	(125)	(200)
50	13	25	<13	13	(250)	..(388)
75	50	63	25	38	(663)	(713)
95	263	350	175	250	(1163)	(1325)
N° (total data)	739	739	205	205	117	117
Max.	2225	2038	2225	1888	2225	>2375

*: Fluctuations saisonnières, pas une référence.

Pour faciliter l'interprétation des résultats, une représentation graphique est utilisée. Trois niveaux de qualité fongique, choisis en fonction des centiles calculés sont délimités en arrière-plan du graphique pour servir de références: SATISFAISANT (en-dessous du centile 75), ELEVE (entre les centiles 75 et 95) et TRES ELEVE (au-dessus du centile 95). Les résultats sont reportés sur 6 axes correspondant aux 2 catégories de germes mésophiles recherchés isolés aux 3 endroits stratégiques, l'extérieur, la pulsion et l'ambiance.

Figure 11



Dans l'exemple représenté sur le graphique, la concentration en moisissures à la pulsion est nettement plus élevée qu'à l'extérieur ce qui peut faire penser à une contamination au niveau de l'installation. L'identification des moisissures se justifie dans ce cas de manière à compléter le diagnostic.

IV.2.1.3. La poussière déposée sur un support lisse horizontal

Nous avons calculé, pour les moisissures de l'air, plusieurs centiles à partir des résultats obtenus au cours de 166 enquêtes microbiologiques réalisées dans des bâtiments équipés de centrales de conditionnement d'air. Exprimés en CFU/boîte, ces centiles donnent une échelle permettant de situer le niveau de contamination en moisissures d'un bâtiment par rapport aux 166 bâtiments similaires étudiés.

Tableau 22

Centiles	Appreciation	Bacteries 25°C	Bacteries 37°C	Moisissures 25°C	Moisissures 45°C	Actinomycètes 52°C
<C ₂₅	très faible	8	5	6	0	0
C ₂₅ -C ₅₀	faible	9 - 17	6 - 13	7 - 11	0	0
C₅₀-C₇₅	moyen	18 - 34	14 - 28	12 - 23	0 - 1	0
C ₇₅ -C ₉₅	élevé	35 - 81	29 - 85	24 - 51	2	0
>C ₉₅	très élevé	>82	>85	>51	>2	0
N		190	192	186	143	143

L'identification des moisissures et, dans certains cas, des bactéries est indispensable pour compléter le diagnostic.

IV.2.1.4. La poussière dans les tapis plain

Les moisissures

239 échantillons de poussières ont été analysés sur le plan fongique à l'ISP. Les résultats nous ont permis de recalculer les valeurs centiles. 90 % des échantillons analysés se situaient sous le seuil de 100 CFU/mg calculé précédemment. Moins de 5% présentaient des valeurs excessivement élevées révélant une contamination sérieuse.

Tableau 23

Moisissures	Mésophiles	Xérophiles	Xérophiles
Milieu gélosé	MEA Chloramphénicol	M40Y	M40Y+NaCl
5	1	2	1
25	6	5	2
50	12	10	5
75	37	24	12
85	60	50	24
90	100	72	47
95	223	166	79
Maximum	1800	600	700
En CFU/mg de poussière tamisée			
N	239	209	209

L'ergostérol

Parallèlement, des échantillons ont été analysés de concert à l'ISP et la FUSAGx. Le tableau 24 ci-dessous n'a pas montré de corrélations entre les résultats du dosage de l'ergostérol et de la fonge revivifiable.

Tableau 24: résultats des analyses de poussière effectuées dans le cadre de ce programme

N° échantillons n°enq/FuSAGx - ISP	Moisissures mésophiles	Moisissures xérophiles	Contaminant	Ergostérol
02/0846/37-31	74	73	Levures: 74	/*
02/0847/22	/	/	/	ND**
02/0869/24-19	16	12	/	6
02/0870/35-31	6	5	/	Traces (< 5 ppm)
02/0874/36-25	24	3	/	ND
02/0874/37-32	9	7	/	ND
02/0873/16	15	31	/	ND
02/0873/23	5	4	/	56
02/0916/36-25	240	80	<i>Penicillium spp.</i> :80	5
02/0916/37-32	44	46	/	10
02/0979/41-32	32	26	/	16
02/0979/40-25	60	25	/	26
02/0921/22-19	60	9	/	ND
02/0920/30-19	50	6	/	ND
02/0920/31-26	25	8	/	9
02/1050/32-30	/	/	/	ND
02/1051/27-25	6	2	/	12
02/1050/28-26	6	14	/	/
02/1174/28-25	31	16	/	ND
02/1200/28-25	10	2	/	12
02/1201/36-25	2	7	/	/
02/1201/37-32	1	4	/	ND
02/1232/34-31	2	1	/	31
02/1209/37-25	40	6	/	31
02/1209/36-33	15	3	/	Traces (< 5 ppm)

IV.2.2. ARCHIVES, BIBLIOTHEQUE

Des archives, des livres et autres documents contaminés peuvent présenter un risque pour les personnes qui les manipulent ou les déplacent. Nous avons été appelés pour 2 cas. Le premier cas concernait une contamination fongique assez grave de livres précieux. Outre les dégâts occasionnés sur ces ouvrages, se posait le problème d'évaluation des risques pour la santé des personnes travaillant dans ces locaux.

Le deuxième cas concernait des archives contaminées dans une banque. Après avoir évalué les risques pour la santé des travailleurs, nous avons suivi dans le temps la contamination après plusieurs nettoyages successifs des rayonnages et des locaux

IV.2.2.1. Bibliothèque et livres précieux

Sur les reliures, les moisissures dominantes étaient *Penicillium*, et *Trichoderma*. Dans l'air, *Penicillium spp.*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ustus*, dominaient (souvent plus de 1 500 CFU/m³).

IV.2.2.2. Banque, salle d'archives

Des analyses mycologiques de l'air ont été réalisées suite à une infiltration d'eau ayant entraîné des développements fongiques sur plusieurs lots d'archives, et principalement avec une moisissure du papier dominante, *Chaetomium*. Après le premier constat, des nettoyages des rayonnages ont été effectués, ce qui a entraîné une augmentation des spores dans l'air. Ce n'est qu'après le troisième nettoyage que la situation s'est améliorée.

Nous avons suivi l'évolution de la concentration totale en spores fongiques (courbe du haut), et celle du contaminant *Chaetomium*. Il a fallu plusieurs nettoyages successifs pour revenir à une situation normale.

IV.2.3. ENVIRONNEMENT DE TRAVAIL INDUSTRIEL

IV.2.3.1. Industries métallurgiques, les fluides de coupe

Analyses microbiologiques des fluides de coupe

Analyses ponctuelles d'échantillons

Des échantillons de fluide de coupe reçus à l'ISP ont été analysés. L'un des échantillons contenait une forte concentration en *Fusarium spp.*

Tableau 25: résultats des analyses microbiologiques de 5 fluides de coupe.

Echantillons	Thermoacti nomycètes à 52°C	ATP	Bactéries totales à 25°C en CFU/ml	Bactéries totales à 37°C en CFU/ml	Moisissures à 25°C en CFU/ml	Ergostérol en ng/ml
02/0232/3	0	/	>4 560 000	4 170 000	10	/
02/0232/5	0	210/6/2600	>2 140 000	>1 800 000	1 100 <i>Fusarium spp.(100%)</i>	0.6
02/0972/1	0		0	440	0	0
02/1267/1	0		90	40	0	0
02/1267/2	0		>4 960 000	>5 000 000	0	0

Etude d'un site métallurgique

Comme lors de la campagne de mesures précédente, dans les huiles entières, aucune bactérie et/ou moisissure n'a poussé sur les milieux de culture respectifs. Ceci confirme fort bien l'absence d'ergostérol et les faibles valeurs en endotoxines retrouvées dans ces huiles.

Dans les échantillons prélevés en mai 2003 les dénombrements des bactéries totales (à 25°C et 37°C) et des bactéries Gram- (à 37°C) des 2 huiles aqueuses usagées ont été impossibles à effectuer tant le nombre de colonies développées était élevé, même aux dilutions les plus élevées.

Parmi les échantillons de la campagne de mesures d'octobre 2003, seule l'huile synthétique restait fort contaminée tandis que l'huile semi-synthétique enregistrait une forte diminution. Nous retrouvons cependant pour les 6 huiles de coupe investiguées une excellente cohérence entre les différents paramètres mesurés. (Données chimiques (endotoxines et ergostérol) et données microbiologiques (comptage des bactéries Gram- et des moisissures)).

Lors de la campagne de mesure en octobre 2003, un échantillon d'huile semi-synthétique contenait 6 000 000 CFU/ml de Bactéries Gram-. C'est dans cette cuve que l'on a mesuré les plus hautes teneurs en endotoxines (plus de 76.944 UE/ml)

Dosage de l'ergostérol dans les fluides de coupe

Analyses ponctuelles d'échantillons

Les résultats du dosage de l'ergostérol obtenus pour l'échantillon 5 confirment la présence de moisissures.

Tableau 26: résultats des analyses mycologiques et du dosage d'ergostérol de 5 fluides de coupe.

Echantillons	Moisissures à 25°C en CFU/ml	Ergostérol en ng/ml
02/0232/3	10	/
02/0232/5	1 100 <i>Fusarium spp.(100%)</i>	0.6
02/0972/1	0	0
02/1267/1	0	0
02/1267/2	0	0

Etude d'un site métallurgique

Les résultats des dosages d'ergostérol étaient négatifs et confirment l'absence de moisissures (vivantes et mortes) dans les échantillons prélevés sur ce site.

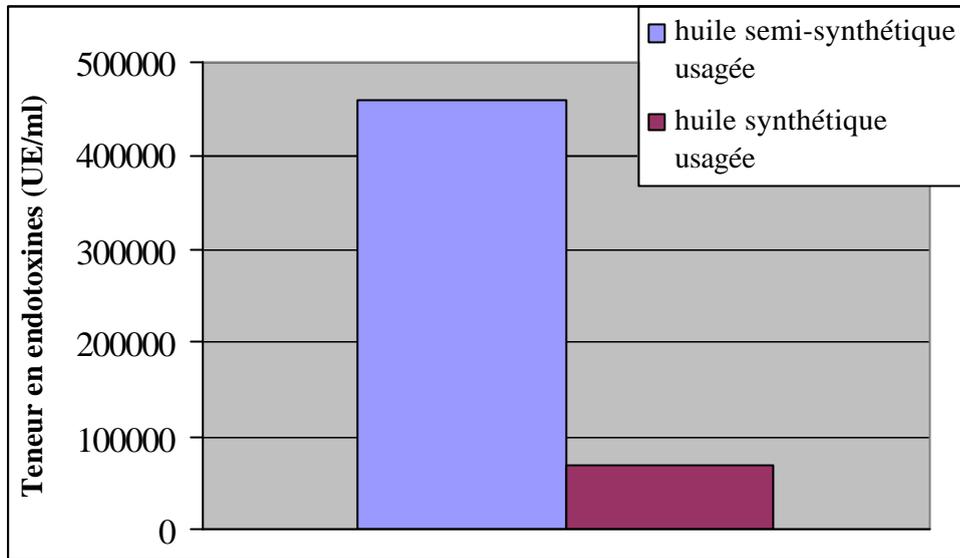
Le dosage des endotoxines dans les fluides de coupe

Dosages préliminaires et mise au point

Le dosage préliminaire des endotoxines dans les 6 huiles de coupe a été effectué par les méthodes chromogéniques cinétique (405 nm) et "point final" avec couplage diazoté (545 nm). Le protocole d'analyse est identique à celui utilisé pour les eaux sauf que ces huiles ont nécessité des dilutions plus importantes. Notons que les 2 huiles entières ont préalablement été diluées 2 x avec du Tween 80 à 0,01 % (afin de faciliter les opérations de dilution).

Comme première conclusion on nous avons constaté que l'huile entière présentait une concentration faible en endotoxines (12 UE/ml). Par contre, les 2 fluides de coupe en solution aqueuse (la synthétique et davantage encore la semi-synthétique) ont montré des teneurs très largement supérieures à 500 UE/ml (dernière classe proposée dans le tableau 18 pour les eaux d'humidification).

Figure 12



Etude d'un site métallurgique

Par la suite, un seul site (industrie métallurgique) a été investigué mais il a été suivi dans le temps (voir annexe B)

Le dosage des endotoxines dans les huiles de coupe s'est fait par la méthode chromogénique cinétique (basée sur le temps de réaction pour atteindre une densité optique égale à 0,3).

Lors d'une première campagne de mesure en octobre 2003 (Tableau 1, annexe B), on observe que les teneurs en endotoxines retrouvées dans les 2 huiles entières (usagées et vierges) sont très faibles (0 UE/ml) mais logiques: ces huiles, totalement dépourvues en eau, offrent des conditions défavorables à la propagation bactérienne. Par contre, les teneurs retrouvées dans les dispersions aqueuses (huiles semi-synthétiques et synthétiques) usagées restent énormes (respectivement 3 350 UE/ml et 28 235 UE/ml) mais moins que pendant la campagne de mesures précédente, et beaucoup plus élevées que celles obtenues dans leurs homologues vierges (0 UE/ml). Au cours d'une deuxième campagne de mesures en décembre 2003 (Tableau 2, annexe B), un échantillon d'huile semi-synthétique contenait plus de 76 944 UE/ml.

IV.2.3.2. Usine de fabrication de fibres synthétiques

Dans ce cas, la spécificité du process sur le plan climatique exige, en permanence, des conditions très humides (>90% d'humidité). Les analyses de surfaces effectuées sur les murs indiquaient notamment la présence de: *Fusarium spp.*, *Acremonium*, levures, *Phoma*, etc. Dans les humidificateurs, nous avons isolé des quantités élevées en bactéries (max: 7 960 000 CFU/ml) et en *Thermoactinomyces vulgaris* (parfois plus de 13 CFU/ml). En plus des analyses de surfaces et d'eau, de nombreuses analyses d'air ont été effectuées et ont donné des résultats parfois fort élevés (max. bactéries 25°C: > 2 400 CFU/m³). En conclusion, les exigences microclimatiques sont propices à des contaminations microbiologiques très diverses, et ce qui place ce secteur dans nos priorités.

Tableau 27: Quelques résultats quantitatifs obtenus dans les bacs de 8 humidificateurs de type laveurs d'air

Janvier 2002	Bactéries 25°C CFU/ml	Bactéries 37°C CFU/ml	Thermoactinomyces totaux CFU/50ml	Thermoactinomyces vulgaris CFU/50ml	Fonge 25°C CFU/ml	ATP
1	>5 130 000	430 000	4	0	400	75 000
2	>2 050 000	1 140 000	0	0	2 900	22 000
3	1 050 000	>64 500	14	6	3500	93 000
4	11 000	450	0	0	18	530
5	>1 130 000	4 100	2	<1	65	1 420 000
6	>2 620 000	72 000	17	1	29	79 000
7	7 960 000	22 800	77	13	1 900	1 300 000
8	430 000	2 600	10	2	1 300	25 500

IV.2.4. LABORATOIRE UTILISANT DE LA BIOMASSE FONGIQUE

Un laboratoire de ce type a été sélectionné. Les techniciens manipulent des lots de céréales contaminées entre autres par du *Fusarium* spp. et de l'*Alternaria* spp. De telles moisissures sont connues pour provoquer chez certaines personnes des réactions allergiques. Elles produisent également des mycotoxines dont le deoxynivalenol, l'altétoxine I et II, l'alternariol, l'acide tenuazonique, etc.

Des Impigers ont également été utilisés pour réaliser les prélèvements d'air. Le pompage d'air s'est effectué au niveau de 4 locaux : une salle de broyage des céréales ; une salle de manipulation des grains contaminés, une chambre d'incubation pour la croissance des moisissures et une salle de conservation de pommes située dans le même bâtiment. Le suivi de ce dernier site a été envisagé pour rechercher l'éventuelle occurrence de moisissures produites par le pourrissement des fruits.

Dans ce cas, tous les prélèvements se sont révélés négatifs avec les 2 méthodes.

IV.2.5. SECTEUR DE LA CONSTRUCTION

IV.2.5.1. Les nouveaux matériaux à base de produits de recyclage

A. Dans ce secteur, de nouveaux matériaux faisant appel à des produits naturels comme des déchets végétaux, sont de plus en plus utilisés. En tant que matériel végétal, d'anciennes contaminations microbiologiques ne sont jamais exclues et peuvent constituer un risque pour la santé des ouvriers lors de la mise en oeuvre.

Des fibres végétales, destinées à l'isolation des planchers ou à la fabrication de panneaux de construction, ont été analysées au laboratoire sur la demande du fabricant du produit. Les résultats des analyses fongiques du produit brut ont montré la présence de moisissures spécifiques dans certains échantillons, notamment des espèces xérophiles comme *Wallemia sebi* et *Aspergillus glaucus* gr..

B. Toujours dans ce secteur, des analyses d'air ont été effectuées au cours d'un traitement d'assainissement fongique dans un habitat. Les ouvriers travaillant dans ce secteur sont particulièrement exposés tant aux moisissures qu'aux produits de désinfection.

Tableau 28: teneurs en moisissures et en ergosterol dans des fibres végétales destinées au domaine de la construction

	Fonge mésophile en CFU/mg	Fonge xérophile en CFU/mg	Fonge très xérophile en CFU/mg	Ergostérol En ug/gMF
Fibre brute	75 500	128 000	3 000	15.04 ± 0.83
Fibre non traitée	50 000	78 000	27 000	12.16 ± 0.85

IV.2.5.2. Désinfection, assainissement des bâtiments

Nous avons suivi des opérations de nettoyage et d'assainissement de sites contaminés par des moisissures. Le but était d'évaluer les concentrations fongiques de l'air auxquelles les travailleurs de ce secteur peuvent être exposés.

Avec la méthode microbiologique classique, on constate que les résultats sont nettement plus élevés dans le local (voir ci-dessous). On peut également constater une augmentation au cours du temps. Le dosage d'ergostérol avec cette technique n'apporte guère de renseignements et semble manquer de sensibilité.

Local	Moisissures CFU/m ³	Ergostérol (ng/m ³)	
1a	6	5	Couloir de l'immeuble: a
2a	18	5	
3a	22	5	
1b	8	5	Hall d'entrée : b
2b	26	5	
3b	38	109	
1c	10	5	Local très contaminée: c
2c	262	5	
3c	310	5	

a: prise d'air avant toute intervention

b. prise d'air pendant la pulvérisation d'un produit fixant sur les murs contaminés de la chambre

c. prise d'air pendant l'enlèvement du papier peint contaminé

L'expérimentation présente dès lors 2 gradients:

- un gradient dans l'espace, de a à c, on s'éloigne de la zone contaminée
- un gradient dans le temps, de 1 à 3, l'intervention d'assainissement allant en s'accroissant

IV.2.6. Secteur Agricole

Des prélèvements d'air ont été réalisés dans des minoteries. Dans ce genre d'industrie, des lots de froment sont transformés en farine après un certain nombre de circuits comportant le nettoyage, le séchage, la mouture et le tamisage. Au cours de tout le processus de transformation des grains en farine, depuis le transport jusqu'au conditionnement du produit fini, le risque d'une contamination est toujours possible.

Nous nous sommes intéressés à la salle de broyage. En effet suite à la mouture des grains des aérosols potentiels peuvent être libérés et présenter un risque pour les travailleurs responsables de la gestion de tout le processus de production de farine.

Tableau 29: Résultats

	Fonge mésophile en CFU/m3	Fonge xérophile en CFU/m3	Ergostérol en µg/m3	Activité
02/1487/008	5	2	ND	
02/1487/009	45	6	ND	
02/1487/010	5	4	ND	
02/1487/011	18	2	ND	
02/1487/012	19	20	ND	
02/1487/013	2	3	ND	
02/1467/001	31	/	0.38	+
02/1467/002	37	/	2.3	+

Dans le cas présent, la méthode microbiologique s'est avérée plus sensible que la méthode chimique. De plus, il n'apparaît aucune corrélation entre les résultats.

V. DISCUSSION

Pistes de valorisation des résultats de la recherche

La recherche subsidiée par le PSF a généré un partenariat particulièrement fructueux entre l'ISP et la FUSAGx. Les travaux menés conjointement ont débouché sur l'élaboration de procédures visant à objectiver la bio-contamination des lieux de travail ainsi que la fixation de valeurs guide (encore provisoires) indicatives. Dans ce qui suit, les potentialités de valorisation sont décrites à deux niveaux: le premier concerne les axes de recherches complémentaires à cibler et le second reprend une série de considérations plus générales sur l'activité en "indoor pollution" au niveau belge.

§A. Axes de recherches et d'actions complémentaires

A l'issue d'un programme de 3 années de recherche, des tendances se dégagent quant à la suite à donner aux travaux méthodologiques à caractère microbiologique et chimique:

1. envisager un aspect pré-normatif aux procédures développées (passage du niveau de procédures au niveau de directives) validées et rédigées sous forme standardisée accessible au plus grand nombre. Si un consensus intervient en la matière il sera peut-être souhaitable de réaliser des tests circulaires "normatifs" (Ring Tests) entre laboratoires partenaires.
2. accroître par l'expérience journalière les bases de données qui sous-tendent les valeurs guide qui ont été dégagées. Par ailleurs il y aurait lieu de multiplier les campagnes analytiques dans des environnements encore plus diversifiés. En dehors des sites investigués dans la présente convention et à la demande de la médecine du travail, il a été possible de réaliser des enquêtes dans des milieux très fortement contaminés. A cet égard, une recherche concertée conjuguant les efforts d'équipes interdisciplinaires s'appuyant sur un réseau de médecins, mériterait d'être développée. Une telle démarche serait axée prioritairement sur la prévention et la définition exacte du ou des risques pour la santé (voir §B)
3. des progrès substantiels ont été obtenus quant à l'étude des lieux de travail. Néanmoins, la présente recherche devrait être continuée, notamment dans les développements méthodologiques et l'acquisition de données chiffrées qui donneront une pertinence accrue en tant qu'outil de surveillance et d'aide à la décision. A cet égard, la recherche de micro-organismes spécifiques à des environnements particuliers, de même que la détection de composés tels que les MVOCs, les mycotoxines et les endotoxines (substances à la fois indicatrices de contamination et délétères en tant que telles) méritent une attention particulière. Pour ce faire, des équipements nouveaux et de très haute technologie (acquis ou en cours d'acquisition par la FUSAGx) permettraient de rencontrer efficacement ces préoccupations.
4. des travaux récents ont démontré qu'il peut y avoir des associations relevant un peu du commensalisme entre bactéries et moisissures. Il y a là un champ d'investigation qui pourrait être retenu. Dans cette optique les compétences du mycologue, du bactériologiste et du chimiste trouveraient une complémentarité de bon aloi.

L'énumération qui précède n'est en rien exhaustive ni hiérarchisée. Elle émane de réflexions éclairées par les résultats de la recherche. Il semble en effet pour les partenaires qu'il y a un intérêt certain à poursuivre dans la voie tracée car les implications socio-économiques de la bio-contamination est directement liée au bien-être au travail et relève d'une facette de la santé publique.

En terme d'actions diverses tendances sont dégagées: l'implémentation-actualisation de la bibliographie traitant du sujet et l'entretien-actualisation du site web développé durant cette

convention et celle qui précède. Par ailleurs, le versant "sociétal" de la recherche concerne l'information et la vulgarisation des résultats. Divers acteurs de la filière du travail pourraient avantageusement être intéressés par les problématiques évoquées dans la recherche.

§B. Considérations générales sur l'activité en "indoor pollution" au niveau belge

L'impact de la pollution environnementale est considéré actuellement comme un véritable fléau de niveau mondial. Les grandes conférences inter-états qui se sont tenues ces dernières années ont mis en lumière de nombreux changements et risques pour l'humanité et pour les écosystèmes.

Les problèmes liés à la bio-contamination se déclinent sous diverses formes : la première concerne la qualité microbiologique des aliments, ce qui est du ressort de l'agence fédérale de la sécurité alimentaire. La seconde a trait essentiellement à la pollution des environnements intérieurs que ce soit au niveau des habitations privées ou du milieu du travail.

A l'issue de la présente recherche, diverses pistes de réflexion nous amènent à envisager cette problématique sous un aspect plus global relevant d'une politique de développement.

Les problèmes de contaminations dans les environnements intérieurs, ont été largement évoqués à propos de l'incidence de l'allergie ou concernant des maladies infectieuses de plus en plus fréquentes, telles que la légionellose. Ceci a conduit à une prise de conscience d'une problématique difficile à cerner car essentiellement diffuse et multifactorielle. En effet, les liens de causes à effets entre la mise en évidence d'un problème de santé et l'occurrence de micro-organismes potentiellement délétères sont extrêmement complexes, et particulièrement délicats en milieu de travail. Des facteurs biotiques, abiotiques, voire même psychologiques sont à intégrer dans une perspective analytique. La mise en œuvre d'une réflexion-action à ce sujet nécessite une approche transdisciplinaire qui implique à la fois recherche, information et vulgarisation, sous-tendues par une réglementation. La coordination en cette matière devrait, à terme, conduire à la création d'une structure fédérale réunissant les compétences indispensables, tant scientifiques que médicales et juridiques, débouchant sur une concertation avec le milieu du travail.

En tenant compte des structures déjà établies, et dans le respect des équilibres au niveau fédéral, une unité centralisée de recherche serait, à l'instar d'autres pays, propre à développer une recherche appliquée dans le domaine de la bio-contamination des environnements intérieurs. Il s'agirait là d'une structure fédérale de référence qui aurait comme prérogative essentielle la recherche méthodologique, l'élaboration de tests inter-laboratoires ainsi que la participation, dans son domaine propre, aux activités de l'Institut Belge de Normalisation. Cette unité pourrait d'une part fournir des protocoles standardisés aux organismes qui assurent les interventions et les diagnostics sur le terrain, et d'autre part assurer des actions ciblées de vulgarisation et d'information.

L'unité centralisée suggérée ci-dessus pourrait, de par son rôle de relais, devenir à terme un interlocuteur au niveau Européen.

VI. ANNEXES

Huiles de coupe (OCTOBRE 2003)											
Echantillons d'huile		Données chimiques				Données microbiologiques					
Référence	Type d'huile	Concentration en endotoxines (UE/ml) Méthode cinétique (405 nm)	Ergostérol (ng/l)	pH	ATP	Bactéries totales à 25°C (CFU/ml)	Bactéries totales à 37°C (CFU/ml)	Bactéries Gram-négatives (CFU/ml)	Moisissures mésophiles (CFU/ml)	Moisissures sur Malachite green (CFU/ml)	
03/1474/01	Entière usagée	0	<5	7,08	59	0	0	0	2	1	
03/1474/02	Entière vierge	0	<5	6,44	20	20	0	0	0	0	
03/1474/03	Semi-synthétique usagée	3 350	<5	8,60	99	0	0	2 200	0	0	
03/1474/04	Semi-synthétique vierge	0	<5	9,14	25	0	0	0	0	0	
03/1474/05	Synthétique usagée	28 235	<5	8,0	86 500	>16 000 000	>10 000 000	>10 000 000	1	0	<i>Trichoderma: 1</i>
03/1474/06'	Synthétique vierge	0	<5	9,14	23	0	0	0	0	0	
03/1474/07	huile non recyclée	2 331	3000	8,34	58	80	0	40	0	0	
03/1474/08	huile recyclée	28 643	<5	8,39	98	6 000	?	40	0	0	

Tableau 1: Résultats des analyses effectuées sur 8 huiles de coupe prélevées le 13 octobre 2003)

Huiles de coupe (DECEMBRE 2003)										
Echantillons d'huile		Données chimiques		Données microbiologiques						
Référence	et type d'huile	Concentration en endotoxines (UE/ml) <i>Méthode cinétique (405 nm)</i>	Ergostérol (Ng/l)	pH	ATP	Bactéries totales à 25°C (CFU/ml)	Bactéries totales à 37°C (CFU/ml)	Bactéries Gram-négatives (CFU/ml)	Moisissures mésophiles (CFU/ml)	Identification des moisissures
03/1756/3		2 048		8,87	46	0	0	0	0	
03/1756/5		22 261		8,35	1 400	320 000	140 000	200	0	
03/1756/7		2 432		8,47	37	40	20	0	0	
03/1756/8		4 070		9,02	880	40	0	0	0	
03/1756/9		7 508		8,79	63	80	40	0	0	
03/1756/10		8 625		8,80	220	400	40	0	0	

03/1756/11		10 236		8,98	610	60	60	0	0	
03/1756/13		5 323		8,78	230	100	40	0	0	
03/1756/16		5 960		9,01	1 300	8 900	40	0	0	
03/1756/17		14 658		8,32	160	0	40	0	0	
03/1756/18		4 738		9,06	13	80	+	0	0	
03/1756/19		24 999		8,99	20	410	210	3 800	0	
03/1756/20		6 504		9,05	91	20	60	0	0	
03/1756/21	Bâtiment B Machine Norte MV 4500 Niveau Machine	76 944		8,62	2 900	>240 000	>600 000	6 000 000	17	

Tableau 2: Résultats des analyses effectuées sur 8 huiles de coupe prélevées le 2 décembre 2003

1. OBJECTIFS

L'unité Environnement de la Section Mycologie à l'ISP s'est spécialisée dans les interventions et les analyses microbiologiques dans les bâtiments à bureaux équipés de conditionnement d'air. Ce document décrit les étapes d'une enquête microbiologique de base.

Notre expérience dans ce domaine nous a conduit à élaborer une approche sur site en 4 étapes. Première étape, évaluation et localisation des principaux problèmes de santé dans le bâtiment, et historique du bâtiment (modification, travaux, déménagement, nouveau mobilier, etc. Deuxièmement, compréhension de la façon dont l'air est traité. Troisièmement, inspection suivie d'une inspection détaillée dans les endroits stratégiques. Quatrièmement, prélèvements spécifiques, afin de déterminer les contaminations microbiennes potentielles. Des kits standardisés, constitués de milieux de culture sélectionnés sont systématiquement préparés dans notre laboratoire, pour des analyses de la poussière, de surface, d'air, d'eau, afin d'isoler les germes qui s'accumulent ou qui sont capables de se développer.

2. EVALUATION DES PROBLEMES DE SANTE ET DE L'HISTOIRE DU BATIMENT (Figure 1)

La première étape est de recueillir des informations sur différents types de plaintes et de les localiser dans le bâtiment. Pour faciliter ce travail, une liste de questions a été formulée dans la figure 1 ci-jointe. Ce travail est complété par des questions spécifiques concernant l'historique du bâtiment.

3. SCHEMATISATION DU CIRCUIT DE L'AIR TRAITE DANS LE SYSTEME HVAC ET LE LIEU DE TRAVAIL (Figure 2)

En examinant le plan des installations de traitement d'air, et du bâtiment, on dresse un schéma qui nous permet de suivre le parcours de l'air dans les installations de traitement d'air et dans les bureaux. Un schéma simple d'une installation standard, avec des symboles de référence, est présenté dans le tableau 2. Premièrement, l'air frais est pris de l'extérieur et est parfois mélangé à de l'air vicié (recyclage). Cet air est ensuite filtré, réchauffé ou refroidi (batteries de froid ou de chaud) et humidifié (humidificateur) ou refroidi (batterie de froid) avant d'être pulsé au moyen d'un long et complexe système de gaines (conduits aérauliques) dans les bureaux. De nos jours, pour obtenir plus de flexibilité les températures sont ajustées avec des unités terminales comme des ventilo- ou éjecto-convecteurs installés dans les bureaux.

4. INSPECTION DANS LES INSTALLATIONS DE TRAITEMENT D'AIR ET DANS LE BATIMENT (figure 3)

Après les 2 premières étapes préliminaires, une inspection minutieuse peut commencer. Pour chaque groupe de pulsion/extraction et des bureaux desservis, un check-list des éléments à contrôler et une appréciation de la propreté à partir d'une cotation de 1 à 3 est réalisée. On en profite pour faire les modifications éventuelles sur les schémas dressés au cours de l'étape 2.

5° PROTOCOLES ET ANALYSES MICROBIOLOGIQUES UTILISES

Les 3 premières étapes permettent déjà souvent de dégager bon nombre d'anomalies et de sources potentielles de contamination. A ce niveau de l'enquête, des prélèvements et analyses spécifiques peuvent être réalisées au niveau des points stratégiques. Les protocoles d'échantillonnages sur site et d'analyses microbiologique ou biochimique le plus souvent utilisés font l'objet de procédures détaillées.

5.1. Qualité microbiologique des surfaces

Un kit spécifique de 5 boîtes RODAC (Reversed Over Direct Area Contact) avec différents milieux gélosés incubés à des températures appropriées, est systématiquement utilisés afin de couvrir un grand éventail de germes:

Germes recherchés:

- Les **moisissures mésophiles hygrophiles** (se développant à 25°C sur des matériaux très disponibles en eau libre ou a_w élevé). Parmi les espèces rencontrées, on trouve les espèces phytopathogènes dont l'origine est strictement extérieure (*Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea*, ...) et des espèces pouvant se développer à l'intérieur à des endroits présentant un humidité anormalement élevée (*Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus versicolor*, *Stachybotrys chartarum*, ...), voire dans l'eau (*Exophiala*).
- Les **moisissures mésophiles xérophiles** (se développant à 25°C sur des matériaux peu disponibles en eau libre ou a_w faible). Parmi les espèces xérophiles, le genre *Penicillium* ou *Aspergillus* (*A. glaucus* gr.) sont les

plus fréquemment isolés à l'intérieur des bâtiments.

- Les **moisissures thermophiles (isolées à 45°C)**. Ces moisissures se développent principalement au cours de processus de décomposition de la matière organique avec dégagement de chaleur. Très abondantes dans les processus de compostage, dans la terre (*Aspergillus fumigatus*), leur origine dans les bâtiments à bureaux est le plus souvent extérieure.
- Le dénombrement total des **bactéries se développant à 25°C sur TSA** sont en majorité des bactéries susceptibles de se développer dans l'environnement. Présentes en quantités élevées elles traduisent une contamination au niveau du site.
- Le dénombrement total des **bactéries se développant à 37°C sur TSA** sont en majorité des bactéries d'origine humaines. Présentes en quantités élevées dans un bâtiment, elle traduisent une ventilation insuffisante et/ou un environnement surpeuplé.
- Le dénombrement total des **bactéries Gram-** qui sont responsables de la présence des endotoxines dans l'environnement
- Remarques: La recherche de bactéries plus spécifiques sort du cadre de cette approche préliminaire.

5.2. Les surfaces

Les prélèvements sont effectués sur les filtres (face « propre »), sur les parois des batteries de chauffe et de froid, des humidificateurs (parois, surfaces de ruissellement, pare-gouttelettes), des pales des ventilateurs d'extraction et de pulsion, des conduits aérauliques (parois intérieures), et des bouches de pulsion ou des ventilo-convecteurs dans des aires de travail. Ces endroits sont en effet considérés sur le plan micro-biologique comme les endroits stratégiques.

Dans des environnements de travail, le kit de boîtes RODAC est principalement employé pour évaluer la sédimentation des germes sur les surfaces horizontales (méthode de sédimentation). Pour l'étalonnage de cette méthode nous avons installé une méthode simple : un morceau de verre (20cm x 20cm) est préliminairement lavé avec la solution d'alcool, et est parti sur des meubles pendant 7 jours. Après cette période, la surface est analysée avec ce kit de RODAC. [Voir procédure détaillée ISP/MYC/AC04](#)

5.3. L'eau

Voir procédures détaillées [ISP/MYC/AC05](#), [ISP-FUSAGx/AC07](#), [FUSAGx-ISP/AC08](#)

5.4. L'air

Voir procédures détaillées [ISP/MYC/AC02](#), [ISP/MYC/AC03](#)

5.5. Les poussières de tapis plain et autres supports similaires

Voir procédures détaillées [ISP/MYC/AC06](#)

9. REFERENCE

Microbiological controls in air conditioning systems: a standard preliminary approach
Camille Chasseur, Anne-Marie Verhaegen, Sébastien Gofflot, Nicole Nolard.
Proceedings of Healthy Buildings 2000, Espoo, Finland : 555-560

Figure 1

MEDICAL DATA SHEET:	BUILDING: :	Reference: .. /																		
Symptoms	Check <input type="radio"/> for corresponding symptoms (for 20 people)																			
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20																			
conjunctivitis	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
rhinitis	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
sneezing	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
dry throat	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
headache	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
drowsiness	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
fatigue (overwhelming)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
respiratory problems	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
asthma	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
flu-like symptoms	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
fever	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
skin problem	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
hypersensitivity pneumonitis	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Legionnaire's disease	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
other	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	<u>Health improving is observed</u>																			
<u>during:</u>	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20																			
week-end	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
holiday longer than a week	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
every beginning of the week	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
at a precise period of the year	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
other	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
	<u>Symptoms may appear:</u>																			
at home	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
in the car	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
in the train	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
during sports activities	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<u>Work area is:</u>	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20																			
open-plan office	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
individual office	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
area without window	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
archives	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
car (commercial activity)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
cluttered room	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
other	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<u>other observations:</u>	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20																			
you are a smoker	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
non smoker, with smokers	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
working on a computer	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
difficult relations with co-workers	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
stress, extra load of work	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
uninteresting job	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<u>Localisation</u>	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20																			
Area identification																				
Corresponding pulsion group																				
	<u>Remarks</u>																			
																			
																			
																			
																			

Figure 2

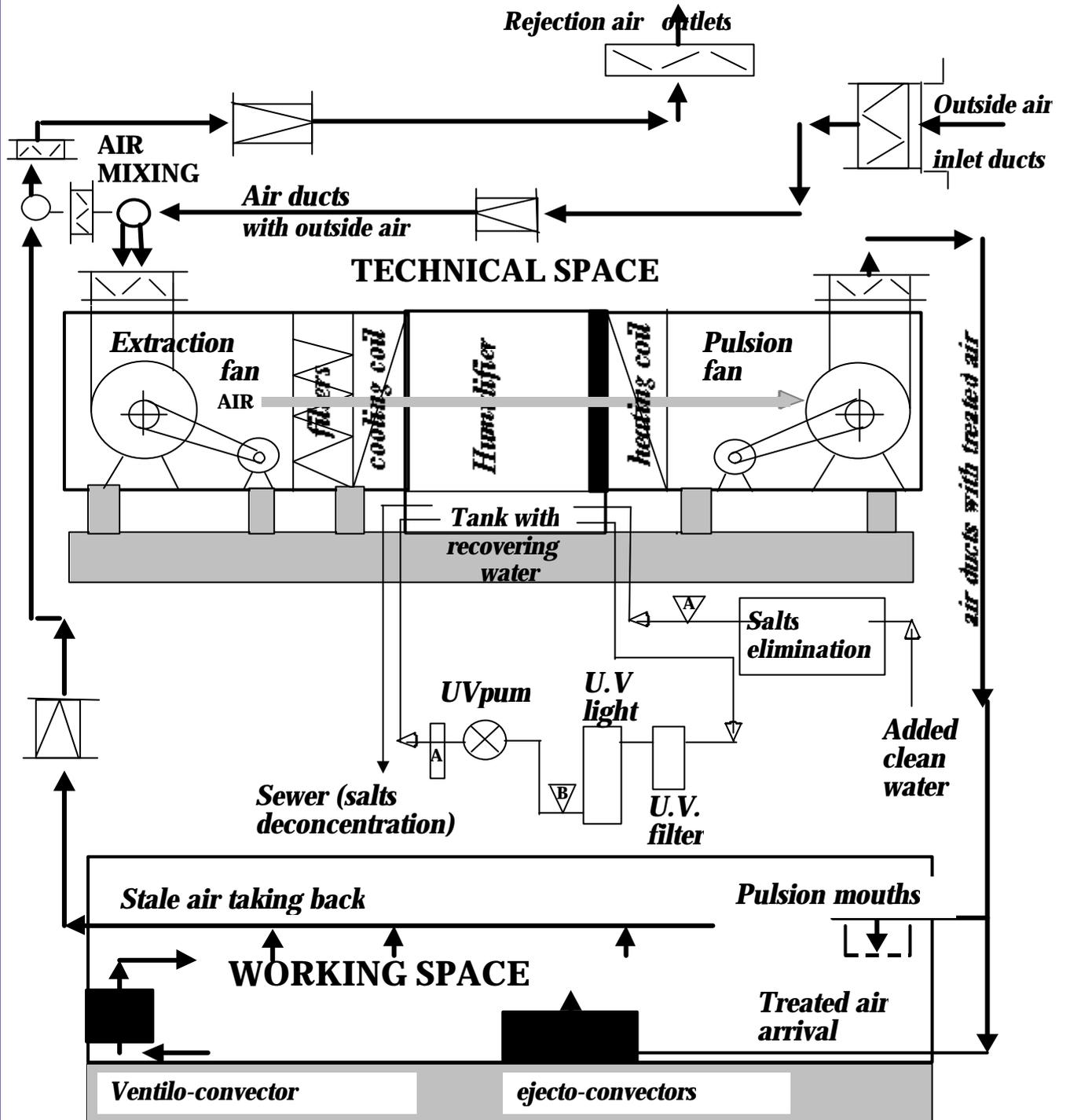


Figure 3

TECHNICAL DATA SHEET	1: visual control of the system	Date: ../. /
<p>○: to check if the indicated parameter is present + Evaluation: (1: satisfactory; 2: average; 3: bad)</p> <p><u>Fresh air intake</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> on the roof <input type="checkbox"/> cooling tower nearby <input type="checkbox"/> bird droppings 1-2-3 <input type="checkbox"/> heavy traffic 1-2-3 <input type="checkbox"/> underground parking lots <input type="checkbox"/> nearby air outlets <input type="checkbox"/> vegetation <input type="checkbox"/> others: <input type="checkbox"/> odours 1-2-3 <input type="checkbox"/> environmental quality of the fresh air intake: 1-2-3 <input type="checkbox"/> appearance of the fresh air intake grids : 1-2-3 <p><u>HVAC unit</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> serial number: <input type="checkbox"/> operated on: <input type="checkbox"/> capacity:m3/h <input type="checkbox"/> recycling:% fresh air <input type="checkbox"/> No mechanical extraction of stale air <p><u>Technical layout: detailed walk through</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> accessibility: 1-2-3 <input type="checkbox"/> silencers: 1-2-3 <input type="checkbox"/> pre-filters: 1-2-3 category:..... <input type="checkbox"/> filters: 1-2-3 category:..... airtightness : 1-2-3 <input type="checkbox"/> filters after humidifier:1-2-3 category:..... <input type="checkbox"/> preheat battery: 1-2-3 <input type="checkbox"/> cold battery: 1-2-3 <input type="checkbox"/> heat battery: 1-2-3 <input type="checkbox"/> humidifier off <input type="checkbox"/> humidifier on <input type="checkbox"/> water tank global outlook: 1-2-3 <input type="checkbox"/> odours 1-2-3 <input type="checkbox"/> flock formation in tank bottom 1-2-3 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> wall corrosion 1-2-3 <input type="checkbox"/> mineral deposit on walls 1-2-3 <input type="checkbox"/> slime deposit on walls 1-2-3 <input type="checkbox"/> spray line 1-2-3 <input type="checkbox"/> "Amazone" area 1-2-3 <input type="checkbox"/> "alveolar" area 1-2-3 <input type="checkbox"/> demineralized water <input type="checkbox"/> deconcentration 1-2-3 <input type="checkbox"/> discharge level in tank 1-2-3 <input type="checkbox"/> siphon 1-2-3 <input type="checkbox"/> sterilizer UV/water, off <input type="checkbox"/> sterilizer UV/water, on condition of the tube: 1-2-3 UV hours: <input type="checkbox"/> condition of filter UV: 1-2-3 <input type="checkbox"/> sterilizer UV/air condition of the tubes: 1-2-3 UV hours: <input type="checkbox"/> biocide pump <input type="checkbox"/> mist humidifier <input type="checkbox"/> other type of humidifier:..... <input type="checkbox"/> pulsion tank: 1-2-3 <input type="checkbox"/> pulsion fan: 1-2-3 <input type="checkbox"/> extraction tank: 1-2-3 <input type="checkbox"/> extraction fan: 1-2-3 <input type="checkbox"/> condition of ductwork: 1-2-3 <input type="checkbox"/> air duct accessibility: 1-2-3 <p><u>Microbiological maintenance</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> company:..... <input type="checkbox"/> Name + tel.: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <u>maintenance sheet:</u> ? yes/no <input type="checkbox"/> outside air inlet grid frequency cleaning:..... <input type="checkbox"/> <u>pre-filters:</u> replaced on:: <input type="checkbox"/> repl/frequency:: <input type="checkbox"/> <u>main filter:</u> replaced on:: <input type="checkbox"/> repl/frequency:: <input type="checkbox"/> <u>filter after humidifier:</u> replaced on:: <input type="checkbox"/> repl/frequency:: <input type="checkbox"/> <u>batteries:</u> cleaning frequency:: <input type="checkbox"/> vacuumed on: <input type="checkbox"/> cleaning products: 	<ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> heating coil on without pulsion(in winter): yes/no <input type="checkbox"/> <u>water tank</u> dry out WE: yes/no dry out summer: yes/no dry out night: yes/no cleaning frequency: <input type="checkbox"/> disinfection frequency:..... <input type="checkbox"/> kind of disinfectant: <input type="checkbox"/> disinfection concentration: <input type="checkbox"/> last cleaned on: <input type="checkbox"/> last pH measure on: <input type="checkbox"/> last conductivity measure on: <input type="checkbox"/> last microb. control on: <input type="checkbox"/> UV/water steriliser: yes/no cleaning freq. of filter: <input type="checkbox"/> cleaning freq. of tube: <input type="checkbox"/> UV/air steriliser: yes/no cleaning freq. of tube: <input type="checkbox"/> permanent disinfection:yes/no manual, frequency: <input type="checkbox"/>automatic, outflow: <input type="checkbox"/> kind of biocide: <input type="checkbox"/> pulsion fan housing cleaning frequency : <input type="checkbox"/> extraction fan housing cleaning frequency <p><u>Remarks:</u></p> <p><u>Terminal devices in working spaces</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> pulsion mouths: 1-2-3 <input type="checkbox"/> extraction mouths: 1-2-3 <input type="checkbox"/> ventiloconvectors: 1-2-3 <input type="checkbox"/> ejectoconvectors: 1-2-3 <input type="checkbox"/> others:



**14, rue Juliette Wytsman
B-1050-Bruxelles**

Section de Mycologie
Chef de Section: Dr Sc. N. Nolard
e-mail : n.nolard@iph.fgov.be

Contact: Unité Environnements Intérieurs

Responsable: Dr Sc Camille Chasseur

e-mail : c.chasseur@iph.fgov.be

Communication : Clarissa Spencer

e-mail : c.spencer@iph.fgov.be

tél. + 32 (0)2 642 52 12 (mardi et jeudi de 9h30-16h30)

Fax : + 32 (0)2 642 55 19

WEB-SITE de l'ISP-Mycologie: <http://www/indoorpol.be>

Support Scientifique du SSTC

1. OBJECTIFS

L'unité Environnement de la Section Mycologie à l'ISP s'est spécialisée dans les interventions et les analyses microbiologiques dans les bâtiments à bureaux équipés de conditionnement d'air. Ce document décrit la méthodologie de base d'une évaluation fongique totale. Il pose les bases d'une standardisation des méthodes de prélèvements sur site et des traitements des résultats au laboratoire, et fournit une échelle de valeurs guide (centiles) permettant de situer le niveau de contamination du bâtiment.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel: l'impacteur utilisé est le RCS+ de Biotest, utilisant des languettes souples remplies d'un milieu gélosé spécifique. Le volume de base prélevé à l'intérieur des bâtiments est de 80 litres d'air. A l'extérieur, en été, ce volume peut être diminué de moitié.

2.2. Prélèvements Dans les bureaux, l'air est prélevé généralement à 20 cm de la grille de pulsion (air pulsé) en tenant compte de l'inclinaison des déflecteurs, et à la hauteur des tables de travail, c'est-à-dire au niveau de la respiration en position assise (air ambiant).

Les RCS+ doivent être disposés l'un de l'autre à une distance minimum de 1 mètre, et à un minimum de 2 mètres de toute personne. On veillera également à ce que les opérateurs ne "surchargent" pas l'atmosphère ambiante en spores fongiques (mise en suspension des poussières par de nombreux déplacements par exemple), la règle étant de réaliser les mesures en présence des effectifs habituels du local au cours de leurs activités quotidiennes. Les fenêtres doivent être fermées pendant les prélèvements et au moins 2 heures avant ceux-ci.

Au moment de l'enquête, un prélèvement d'air extérieur sera toujours effectué au niveau de la prise d'air afin de servir de contrôle.

3. GERMES RECHERCHES:

- Les **moisissures mésophiles hygrophiles** (se développant à 25°C sur des matériaux très disponibles en eau libre ou a_w élevé). Parmi les espèces rencontrées, on trouve les espèces phytopathogènes dont l'origine est strictement extérieure (*Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea*, ...) et des espèces pouvant se développer à l'intérieur à des endroits présentant un humidité anormalement élevée (*Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus versicolor*, *Stachybotrys chartarum*, ...), voire dans l'eau (*Exophiala*).
- Les **moisissures mésophiles xérophiles** (se développant à 25°C sur des matériaux peu disponibles en eau libre ou a_w faible). Parmi les espèces xérophiles, le genre *Penicillium* ou *Aspergillus* (*A. glaucus* gr.) sont les plus fréquemment isolés à l'intérieur des bâtiments.
- Les **moisissures thermophiles** (isolées à 45°C). Ces moisissures se développent principalement au cours de processus de décomposition de la matière organique avec dégagement de chaleur. Très abondantes dans les processus de compostage, dans la terre (*Aspergillus fumigatus*), leur origine dans les bâtiments à bureaux est le plus souvent extérieure.
- Ce document décrit la méthode utilisée pour une évaluation des moisissures totales. L'étape suivant qui consiste à identifier les moisissures dominantes est détaillée dans la [Fiche ISP/MYCO/03/02](#)

4. MILIEUX DE CULTURE, INCUBATION

Germes	Milieux gélosés	t° incubation	Durée incubation
Moisissures totales mésophiles hygrophiles	HS + DRBC (en été)	25°C	5 jours
Moisissures totales mésophiles xérophiles	DG18 de Biotest	25°C	5 jours
Moisissures totales thermophiles	YM de Biotest	45°C	2 jours

Voir fiches des milieux de culture ci-jointes

5. LECTURE DES RESULTATS

Notion de confluence : lorsque le nombre de colonies est fort élevé, il arrive que le dénombrement manque d'exactitude ou soit impossible, les colonies étant intriquées les unes dans ou sur les autres. On parle alors de confluence, en estimant le nombre de colonies sur base d'un système de classes (tableau ci-dessous).
Classes d'évaluation (CFU/languette)

X: 0 - 10

XX: 11 - 20

XXX: 21 - 30

XXXX >30

Notion d'envahissement : certaines espèces ont la particularité d'envahir les boîtes de culture en moins de 5 jours, ce qui empêche le dénombrement des colonies avec exactitude. Avec certaines espèces très denses une évaluation minimum des espèces sous-jacentes est rendue impossible (*Trichoderma*) : dans ce cas, on indique uniquement le nom de l'espèce envahissante, en indiquant E.

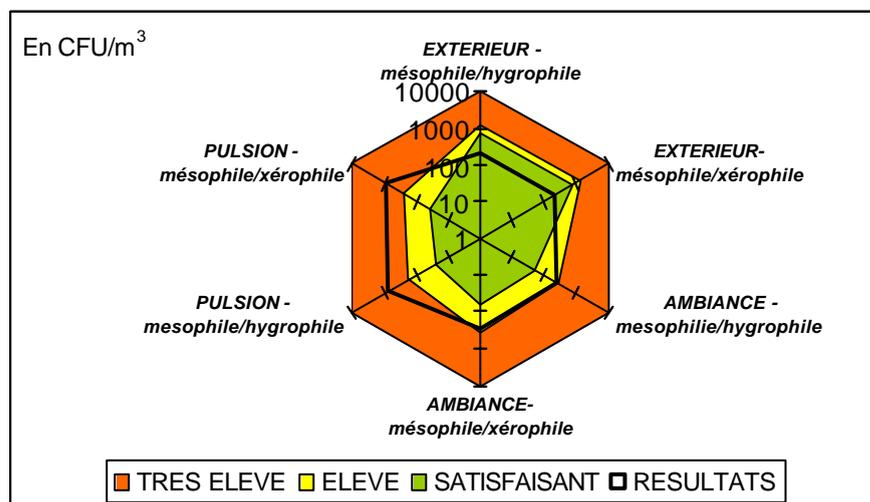
6. GUIDELINES ISP-MYCOLOGIE

Nous avons calculés, pour les moisissures de l'air, plusieurs centiles à partir des résultats obtenus au cours de 166 enquêtes microbiologiques dans des bâtiments équipés de centrales de conditionnement d'air. Exprimés en CFU/m³, ces centiles donnent une échelle permettant de situer le niveau de contamination en moisissures d'un bâtiment par rapport aux 166 bâtiments similaires étudiés. Ces valeurs ne sont cependant pas corrélées avec des problèmes de santé.

Centiles	Air ambiant		Air pulsé		Air extérieur*	
	HS	DG18	HS	DG18	HS	DG18
5	<13	<13	<13	<13	(38)	(88)
25	<13	<13	<13	<13	(125)	(200)
50	13	25	<13	13	(250)	..(388)
75	50	63	25	38	(663)	(713)
95	263	350	175	250	(1163)	(1325)
N° (total data)	739	739	205	205	117	117
Max.	2225	2038	2225	1888	2225	>2375

*: Fluctuations saisonnières, pas une référence.

7. PRESENTATION GRAPHIQUE DES RESULTATS



Pour faciliter l'interprétation des résultats, une représentation graphique est utilisée. Trois niveaux de qualité fongique choisis en fonction des centiles calculés sont délimités en arrière-plan du graphique pour servir de références: SATISFAISANT (en-dessous du centile 75), ELEVE (entre les centiles 75 et 95) et TRES ELEVE (au-dessus du centile 95). Les résultats sont reportés sur 6 axes correspondant aux 2 catégories de germes mésophiles recherchés isolés aux 3 endroits stratégiques, l'extérieur, la pulsion et l'ambiance.

Exemple: dans l'exemple représenté sur le graphique, la concentration en moisissures à la pulsion est nettement plus élevée qu'à l'extérieur ce qui peut faire penser à une contamination au niveau de l'installation. L'identification des moisissures se justifie dans ce cas de manière à compléter le diagnostic.

8. LIMITES D'INTERPRETATION

Il faut rappeler que les résultats obtenus de cette manière concernent uniquement des moisissures encore viables et capables de se développer sur les milieux gélosés choisis, aux températures d'incubation utilisées.

Il est également important de préciser que les niveaux de qualité choisis ne sont pas corrélés avec un niveau de risque pour la santé. Toutefois le principe de précaution peut être appliqué en cas de contaminations élevées.

9. REFERENCE

Microbial Indoor Air Quality in office buildings with central air conditioning installations in Belgium. An easy tool for a fungal quality evaluation. *Camille Chasseur, Sébastien Gofflot, Nicole Nolard*

5th International Conference on Bioaerosols, Fungi, Bacteria, Mycotoxins and Human Health; Saratoga Springs, New York, September 10-12, 2003

ANNEXES 1: COMPOSITION DES MILIEUX GELOSES DE BASE UTILISES

Rose Bengal chloramphenicol agar (HS)	Dichloran Rose Bengal chloramphenicol agar (DRBC)	Dichloran - glycerol agar (DG18)
<i>Bacto peptone</i> 6 g	<i>Bacto peptone</i> 5 g	<i>Dichloran-glycerol agar base</i> 31,5
<i>Dextrose</i> 10 g	<i>Dextrose</i> 10 g	<i>Chloramphenicol</i> ☼ 0,5
<i>KH₂PO₄</i> 0,5 g	<i>KH₂PO₄</i> 1 g	<i>Glycerol 87%</i> 197 g*
<i>K₂HPO₄</i> 0,5 g	<i>Dichloran 0,2% *</i> 1 ml	<i>Eau ultra pure</i> 1 L
<i>MgSO₄.7H₂O</i> 0,5 g	<i>MgSO₄.7H₂O</i> 0,5 g	
<i>Chloramphenicol</i> ☼ 0,5 g	<i>Chloramphenicol</i> ☼ 100mg	
<i>Pastagar</i> 15 g	<i>Pastagar</i> 15 g	
<i>Rose Bengal solution 0.5%</i> 10 ml	<i>Rose Bengal solution 0.5%</i> 5 ml	
<i>Solution oligoéléments*</i> 1 ml	<i>Solution oligoéléments*</i> 1 ml	
<i>Eau ultra pure</i> 1 L	<i>Eau ultra pure</i> 1 L	
Remarque concernant le HS: Ce milieu correspond au YM de Biotest mais convient mieux pour isoler et identifier les moisissures hygrophiles de l'environnement (la teneur en sels du YM de Biotest étant trop élevée)	*Solution Oligo-éléments <i>H₃BO₃</i> 58 mg <i>CuCl₂.2H₂O</i> 270 mg <i>MnCl₂.4H₂O</i> 78 mg <i>ZnCl₂</i> 4,2 g <i>Ammonium molybdate 0,2%*</i> 18 ml <i>FeCl₂.4H₂O *</i> 714 mg <i>Eau ultra pure</i> 1 L	

ANNEXES 2: MATERIEL ET UTILISATION



1. RCS+, de Biotest



2a. Ouverture de la tête du RCS+



2b. Ouverture de la tête du RCS+



3. Une languette de milieu gélosé est soigneusement retirée de son étui stérile



4a. La languette est introduite dans la tête amovible



4b. jusqu'au guide métallique, le milieu gélosé orienté vers l'axe central



5a. Dès que le prélèvement d'air a été effectué, la tête amovible est dégagée



5b. , la languette est ensuite extraite de la tête amovible du RCS+



6a. La languette est réintroduite dans son étui stérile ...



6b. ...le côté gélosé tourné vers la partie la plus convexe de l'étui



**14, rue Juliette Wytsman
B-1050-Bruxelles**

Section de Mycologie
Chef de Section: Dr Sc. N. Nolard
e-mail : n.nolard@iph.fgov.be

Contact: Unité Environnements Intérieurs

Responsable: Dr Sc Camille Chasseur
e-mail : c.chasseur@iph.fgov.be

Communication : Clarissa Spencer
e-mail : c.spencer@iph.fgov.be

tél. + 32 (0)2 642 52 12 (mardi et jeudi de 9h30-16h30)
Fax : + 32 (0)2 642 55 19

WEB-SITE de l'ISP-Mycologie: <http://www/indoorpol.be>

Support Scientifique du SSTC

1. OBJECTIFS

L'unité Environnement de la Section Mycologie à l'ISP est spécialisée dans les interventions et les analyses microbiologiques dans les bâtiments à bureaux équipés de conditionnement d'air. Ce document décrit la méthodologie de base d'une évaluation bactériologique globale. Il pose les bases d'une standardisation des méthodes de prélèvements sur site et des traitements des résultats au laboratoire, et donne une échelle de valeurs guide (centiles) permettant de situer le niveau de contamination du bâtiment.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel: l'impacteur utilisé est le RCS+ de Biotest, utilisant des languettes souples remplies de milieu gélosé. Le volume de base prélevé à l'intérieur est de 80 litres d'air.

2.2. Prélèvements: Dans les bureaux, l'air sera prélevé généralement à 20 cm de la grille de pulsion (air pulsé), en tenant compte de l'inclinaison des volets, et à la hauteur des tables de travail, c'est-à-dire au niveau de la respiration en position assise (air ambiant).

Les RCS+ doivent être disposés l'un de l'autre à une distance minimum de 1 mètre, et à un minimum de 2 mètres de toute personne. On veillera également à ce que les opérateurs ne "surchargent" pas l'atmosphère ambiante en germes bactériens, la règle étant de réaliser les mesures en présence des effectifs habituels du local. Les fenêtres doivent être fermées pendant les prélèvements et au moins 2 heures avant ceux-ci.

Au moment de l'enquête, un prélèvement d'air extérieur sera toujours effectué au niveau de la prise d'air afin de servir de contrôle

3. GERMES RECHERCHES:

- Le dénombrement total des **bactéries se développant à 25°C sur TSA** sont en majorité des bactéries susceptibles de se développer dans l'environnement. Présentes en quantités élevées elles traduisent une contamination au niveau du site.
- Le dénombrement total des **bactéries se développant à 37°C sur TSA** sont en majorité des bactéries d'origine humaines. Présentes en quantités élevées dans un bâtiment, elle traduisent une ventilation insuffisante et/ou un environnement surpeuplé.
- Le dénombrement total des **bactéries Gram-** sont responsables de la présence des endotoxines dans l'environnement
- La recherche de bactéries plus spécifiques sort du cadre de cette approche préliminaire.

4. MILIEUX DE CULTURE, INCUBATION

Germes	Abréviation	Milieux gélosés	t° incubation	Durée incubation
Bactéries totales de l'environnement	EnvB	TC de Biotest TSA actidione	25°C	5 jours
Bactéries totales d'origine humaine	H-SB	TC de Biotest	37°C	2 jours
Bactéries Gram-	Gram-	Mac Conkey Agar	37°C	2 jours

Abréviation des termes en anglais: EnvB: Mesophilic Environmental Bacteria; HSB: Mesophilic Human-Source Bacteria

Voir fiches des milieux de culture ci-jointes

5. LECTURE DES RESULTATS

Notion de confluence: lorsque le nombre de colonies est fort élevé, il arrive que le dénombrement manque d'exactitude ou soit impossible, les colonies étant intriquées les unes dans ou sur les autres. On parle alors de confluence, en estimant le nombre de colonies sur base d'un système de classes (tableau ci-dessous).

Classes d'évaluation (CFU/languette)

X: 0 - 10

XX: 11 - 20

XXX: 21 - 30

XXXX >30

Notion d'envahissement : certaines espèces ont la particularité d'envahir les boîtes de culture en moins de 5 jours, ce qui empêche le dénombrement des colonies avec exactitude. Avec certaines espèces très denses une évaluation minimum des espèces sous-jacentes est rendue impossible (*Bacillus*). Dans ce cas, on indique uniquement le nom de l'espèce envahissante, en indiquant E.

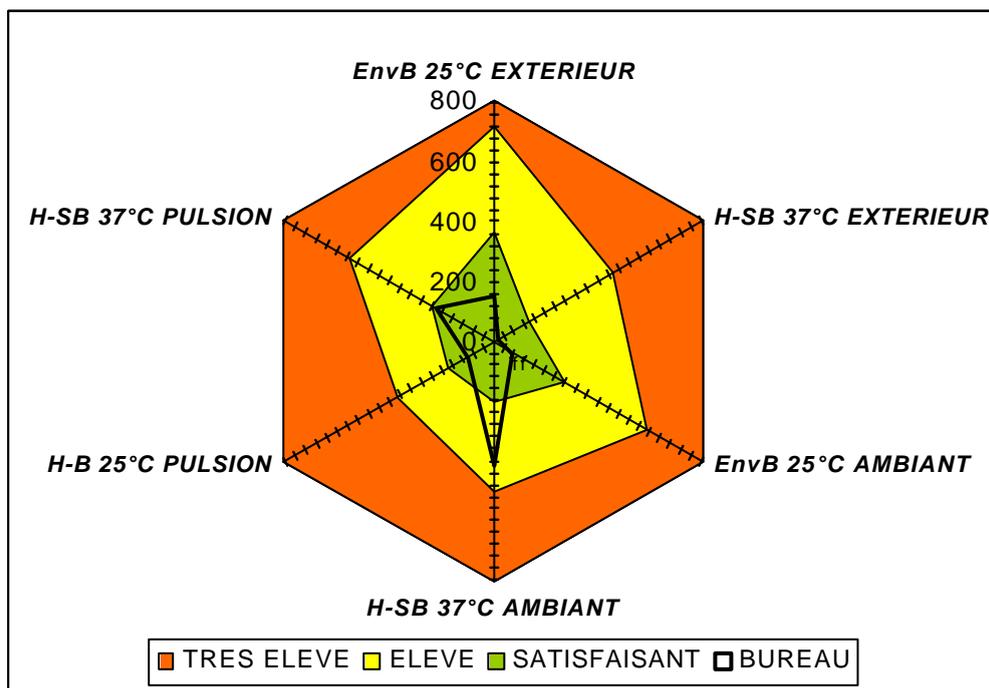
6. GUIDELINES ISP-MYCOLOGIE

Nous avons calculés, pour les bactéries de l'air, plusieurs centiles à partir des résultats obtenus au cours de 166 enquêtes microbiologiques dans des bâtiments équipés de centrales de conditionnement d'air. Exprimés en CFU/m³, ces centiles donnent une échelle permettant de situer le niveau de contamination en bactéries d'un bâtiment par rapport aux 166 bâtiments similaires étudiés. Ces valeurs ne sont cependant pas corrélées avec des problèmes de santé.

Centile	Extérieur		Intérieur Ambient		Intérieur Pulsion	
	EB,25°C	HSB,37°C	EB,25°C	HSB,37°C	EB,25°C	HSB,37°C
5	50	0	25	13	0	0
25	100	25	75	63	38	25
50	213	63	150	125	100	75
75	363	138	275	238	175	138
95	713	450	588	550	375	338
n	122	126	809	812	223	223
Max.	2738	1525	2525	1850	1126	913

EnvB: Mesophilic Environmental Bacteria; H-SB: Mesophilic Human-Source Bacteria

7. PRESENTATION GRAPHIQUE DES RESULTATS



Pour faciliter l'interprétation des résultats, une représentation graphique est utilisée. Trois niveaux de qualité bactériologique en fonction des centiles calculés sont délimités en arrière plan du graphique pour servir de références: SATISFAISANT (en-dessous du centile 75), ELEVE (entre les centiles 75 et 95) et TRES ELEVE (au-dessus du centile 95). Les résultats sont reportés sur 6 axes correspondant aux bactéries H-SB et EnvB isolées aux 3 endroits stratégiques, l'extérieur, la pulsion et l'air ambiant.

Il est important de préciser que ces niveaux de qualité ne sont pas corrélés avec un niveau de risque pour la santé. Toutefois le principe de précaution peut être appliqué en cas de contaminations élevées.

Exemple: Dans l'exemple représenté sur le graphique, la charge en HSB dans l'air ambiant est élevée à la pulsion alors qu'au niveau de la pulsion dans le bureau et à l'extérieur, les résultats indiquent une charge

satisfaisante. On peut conclure à un environnement "surpeuplé" et/ou à une ventilation insuffisante.

8. LIMITES D'INTERPRETATION

Il faut rappeler que les résultats obtenus de cette manière concernent uniquement des moisissures encore viables et capables de se développer sur les milieux gélosés choisis, aux températures d'incubation utilisées.

Il est également important de préciser que les niveaux de qualité choisis ne sont pas corrélés avec un niveau de risque pour la santé. Toutefois le principe de précaution doit être appliqué en cas de contaminations élevées.

9. REFERENCE

Microbial Indoor Air Quality in office buildings with central air conditioning installations in Belgium. An easy tool for a bacterial quality evaluation. *Camille Chasseur, Sébastien Gofflot, V. De Maertelaer, Nicole Nolard*

5th International Conference on Bioaerosols, Fungi, Bacteria, Mycotoxins and Human Health; Saratoga Springs, New York, September 10-12, 2003

ANNEXES 1: COMPOSITION DES MILIEUX GELOSES DE BASE UTILISES

<i>Trypticase soy agar (TSA)</i>	<i>Trypticase soy agar + cycloheximide (TSA + act)</i>	<i>Mac Conckey Agar</i>
<i>Bacto tryptone</i> 15 g	<i>Bacto tryptone</i> 15 g	<i>Peptone</i> 17 g
<i>Bacto soytone</i> 5 g	<i>Bacto soytone</i> 5 g	<i>Proteose peptone</i> 3 g
<i>NaCl</i> 5 g	<i>NaCl</i> 5 g	<i>Lactose</i> 10 g
<i>Pastagar</i> 15 g	<i>Cycloheximide*</i> 100 mg	<i>Bile Salts n°3</i> 1,5 g
<i>Eau ultra pure</i> 1 L	<i>Pastagar</i> 15 g	<i>NaCl</i> 5 g
	<i>Eau ultra pure</i> 1 L	<i>Agar</i> 13,5 g
OU		<i>Rouge Neutre</i> 30 mg
<i>TC (Total Count)</i> de Biotest	<i>* Cycloheximide = Actidione</i>	<i>Cristal Violet</i> 1 mg
		<i>Eau ultra pure</i> 1 L

ANNEXES 2: MATERIEL ET UTILISATION



1. RCS+, de Biotest



2a. Ouverture de la tête du RCS+



2b. Ouverture de la tête du RCS+



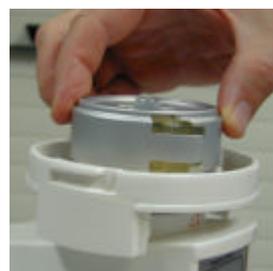
3. Une languette de milieu gélosé est soigneusement retirée de son étui stérile



4a. La languette est introduite dans la tête amovible



4b. jusqu'au guide métallique, le milieu gélosé orienté vers l'axe central



5a. Dès que le prélèvement d'air a été effectué, la tête amovible est dégagée



5b. , la languette est ensuite extraite de la tête amovible du RCS+



6a. La languette est réintroduite dans son étui stérile ...



6b. ...le côté gélosé tourné vers la partie la plus convexe de l'étui



**14, rue Juliette Wytsman
B-1050-Bruxelles**

Section de Mycologie

Chef de Section: Dr Sc. N. Nolard

e-mail : n.nolard@iph.fgov.be

Contact: Unité Environnements Intérieurs

Responsable: Dr Sc Camille Chasseur

e-mail : c.chasseur@iph.fgov.be

Communication : Clarissa Spencer

e-mail : c.spencer@iph.fgov.be

tél. + 32 (0)2 642 52 12 (mardi et jeudi de 9h30-16h30)

Fax : + 32 (0)2 642 55 19

WEB-SITE de l'ISP-Mycologie: <http://www.indoorpol.be>

Support Scientifique du SSTC

1. OBJECTIFS

L'unité Environnement de la Section Mycologie à l'ISP s'est spécialisée dans les interventions et les analyses microbiologiques dans les bâtiments à bureaux équipés de conditionnement d'air. Ce document décrit la méthodologie de base d'une évaluation fongique totale dans la poussière fine déposée. Il pose les bases d'une standardisation des méthodes de prélèvements sur site et des traitements des résultats au laboratoire, et fournit une échelle de valeurs guide (centiles) permettant de situer le niveau de contamination du bâtiment.

2. MATERIEL ET METHODES

La poussière fine de l'air déposée est collectée sur un carreau de verre (20cm x 20cm), préalablement lavé avec un solution d'alcool et déposé sur les meubles dans un bâtiment. Après 7 jours, des échantillons de surface sont réalisés à partir d'un kit de boîtes RODAC (23.74 CM²) remplies avec des milieux gélosés spécifiques. Ces boîtes sont appliquées à l'aide d'un applicateur automatique permettant une pression de 25 gr/cm² pendant 10 secondes (ISO DIS 14698-1). Elles sont ensuite ramenées au laboratoire pour y être incubées à des températures appropriées.

3. GERMES RECHERCHES:

- Les **moisissures mésophiles hygrophiles** (se développant à 25°C sur des matériaux très disponibles en eau libre ou a_w élevé). Parmi les espèces rencontrées, on trouve les espèces phytopathogènes dont l'origine est strictement extérieure (*Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea*, ...) et des espèces pouvant se développer à l'intérieur à des endroits présentant un humidité anormalement élevée (*Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus versicolor*, *Stachybotrys chartarum*, ...), voire dans l'eau (*Exophiala*).
- Les **moisissures mésophiles xérophiles** (se développant à 25°C sur des matériaux peu disponibles en eau libre ou a_w faible). Parmi les espèces xérophiles, le genre *Penicillium* ou *Aspergillus* (*A. glaucus* gr.) sont les plus fréquemment isolés à l'intérieur des bâtiments.
- Les **moisissures thermophiles (isolées à 45°C)**. Ces moisissures se développent principalement au cours de processus de décomposition de la matière organique avec dégagement de chaleur. Très abondantes dans les processus de compostage, dans la terre (*Aspergillus fumigatus*), leur origine dans les bâtiments à bureaux est le plus souvent extérieure.
- Le dénombrement total des **bactéries se développant à 25°C sur TSA** sont en majorité des bactéries susceptibles de se développer dans l'environnement. Présentes en quantités élevées elles traduisent une contamination au niveau du site.
- Le dénombrement total des **bactéries se développant à 37°C sur TSA** sont en majorité des bactéries d'origine humaines. Présentes en quantités élevées dans un bâtiment, elle traduisent une ventilation insuffisante et/ou un environnement surpeuplé.
- Le dénombrement total des **bactéries Gram-** qui sont responsables de la présence des endotoxines dans l'environnement
- Remarques: La recherche de bactéries plus spécifiques sort du cadre de cette approche préliminaire.

4. MILIEUX DE CULTURE, INCUBATION

Germes	Milieux gélosés	t° incubation	Durée d'incubation
Moisissures totales mésophiles hygrophiles	HS + DRBC (en été)	25°C	5 jours
Moisissures totales mésophiles xérophiles	DG18 de Biotest	25°C	5 jours
Moisissures totales thermophiles	YM de Biotest	45°C	2 jours
Bactéries totales de l'environnement (*EnvB)	TC de Biotest TSA actidione	25°C	5 jours
Bactéries totales d'origine humaine (*H-SB)	TC de Biotest	37°C	2 jours
Bactéries Gram-	Mac Conkey Agar	37°C	2 jours

* Abréviation des termes en anglais: EnvB: Mesophilic Environmental Bacteria; HSB: Mesophilic Human-Source Bacteria - Voir fiches des milieux de culture ci-jointes

5. LECTURE DES RESULTATS

Notion de confluence : lorsque le nombre de colonies est fort élevé, il arrive que le dénombrement manque d'exactitude ou soit impossible, les colonies étant intriquées les unes dans ou sur les autres. On parle alors de confluence, en estimant le nombre de colonies sur base d'un système de classes (tableau ci-dessous).

Classes d'évaluation (CFU/boîte)

X: 0 - 10

XX: 11 - 20

XXX: 21 - 30

XXXX >30

Notion d'envahissement : certaines espèces ont la particularité d'envahir les boîtes de culture en moins de 5 jours, ce qui empêche le dénombrement des colonies avec exactitude. Avec certaines espèces très denses une évaluation minimum des espèces sous-jacentes est rendue impossible (*Trichoderma*) : dans ce cas, on indique uniquement le nom de l'espèce envahissante, en indiquant E.

6. GUIDELINES ISP-MYCOLOGIE

Nous avons calculés, pour les moisissures de l'air, plusieurs centiles à partir des résultats obtenus au cours de 166 enquêtes microbiologiques dans des bâtiments équipés de centrales de conditionnement d'air. Exprimés en CFU/boîte, ces centiles donnent une échelle permettant de situer le niveau de contamination en moisissures d'un bâtiment par rapport aux 166 bâtiments similaires étudiés.

Centiles	Appreciation	Bacteries	Bacteries	Moisissures	Moisissures	Actinomycètes
		25°C	37°C	25°C	45°C	52°C
<C ₂₅	très faible	8	5	6	0	0
C ₂₅ -C ₅₀	faible	9 - 17	6 - 13	7 - 11	0	0
C₅₀-C₇₅	moyen	18 - 34	14 - 28	12 - 23	0 - 1	0
C ₇₅ -C ₉₅	élevé	35 - 81	29 - 85	24 - 51	2	0
>C ₉₅	très élevé	>82	>85	>51	>2	0
Total samples		190	192	186	143	143

L'identification des moisissures, et dans certains cas, des bactéries, est indispensable pour compléter le diagnostic.

7. LIMITES D'INTERPRETATION

Il faut rappeler que les résultats obtenus de cette manière concernent uniquement des moisissures encore viables et capables de se développer sur les milieux gélosés choisis, aux températures d'incubation utilisées.

Il est également important de préciser que les niveaux de qualité choisis ne sont pas corrélés avec un niveau de risque pour la santé. Toutefois le principe de précaution peut être appliqué en cas de contaminations élevées.

9. REFERENCE

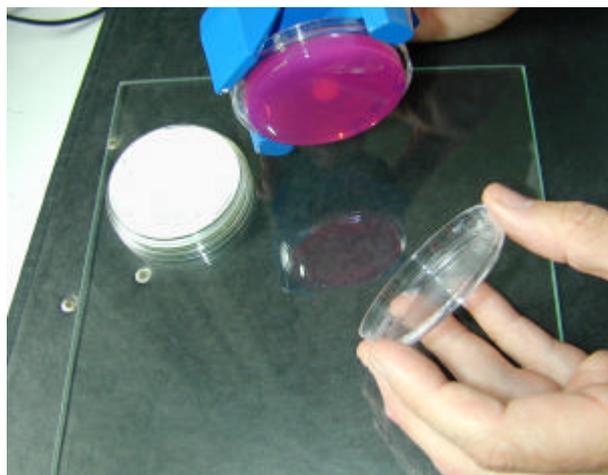
Microbial analysis of deposit dust on surfaces in Buildings offices equipped with central air-conditioning installations: proposed microbial practical values with a new standardized method

Camille Chasseur, Sébastien Gofflot, Nicole Nolard

9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Monterey, California: june 30-July 5, 2002: IV 347-352

ANNEXES 1: COMPOSITION DES MILIEUX GELOSES DE BASE UTILISES

Malt extract agar + chloramphenicol (MC)	Rose Bengal chloramphenicol agar (HS)	Dichloran Rose Bengal chloramphenicol agar (DRBC)
Malt extract 20 g Bacto peptone 1 g Dextrose 20 g Chloramphenicol 0,5 g MgSO ₄ .7H ₂ O 0,5 g KH ₂ PO ₄ 0,5 g Pastagar 15 g Solution d'Oligoéléments* 1 ml Eau ultra pure 1 L	Bacto peptone 6 g Dextrose 10 g KH ₂ PO ₄ 0,5 g K ₂ HPO ₄ 0,5 g MgSO ₄ .7H ₂ O 0,5 g Chloramphenicol 0,5 g Pastagar 15 g Rose Bengal solution 0.5% 10 ml Solution oligoéléments* 1 ml Eau ultra pure 1 L	Bacto peptone 5 g Dextrose 10 g KH ₂ PO ₄ 1 g Dichloran 0,2%* 1 ml MgSO ₄ .7H ₂ O 0,5 g Chloramphenicol 100mg Pastagar 15 g Rose Bengal solution 0.5% 5 ml Solution oligoéléments* 1 ml Eau ultra pure 1 L
*Solution Oligo-éléments	Trypticase soy agar (TSA)	Trypticase soy agar + cycloheximide (TSA + act)
H ₃ BO ₃ 58 mg CuCl ₂ .2H ₂ O 270 mg MnCl ₂ .4H ₂ O 78 mg ZnCl ₂ 4,2 g Ammonium molybdate 0,2%* 18 ml FeCl ₂ .4H ₂ O* 714 mg Eau ultra pure 1 L	Bacto tryptone 15 g Bacto soytone 5 g NaCl 5 g Pastagar 15 g Eau ultra pure 1 L	Bacto tryptone 15 g Bacto soytone 5 g NaCl 5 g Cycloheximide* 100 mg Pastagar 15 g Eau ultra pure 1 L
		*Cycloheximide = Actidione

ANNEXES 2: MATERIEL ET UTILISATION


Les boîtes RODAC sont appliquées sur les plaques en verre à l'aide d'un applicateur automatique



**14, rue Juliette Wytsman
B-1050-Bruxelles**

Section de Mycologie
Chef de Section: Dr Sc. N. Nolard
e-mail : n.nolard@iph.fgov.be

Contact: Unité Environnements Intérieurs

Responsable: Dr Sc Camille Chasseur
e-mail : c.chasseur@iph.fgov.be

Communication : Clarissa Spencer
e-mail : c.spencer@iph.fgov.be

tél. + 32 (0)2 642 52 12 (mardi et jeudi de 9h30-16h30)
Fax : + 32 (0)2 642 55 19

WEB-SITE de l'ISP-Mycologie: <http://www.indoorpol.be>

Support Scientifique du SSTC

1. OBJECTIFS

L'unité Environnement de la Section Mycologie à l'ISP s'est spécialisée dans les interventions et les analyses microbiologiques dans les bâtiments à bureaux équipés de conditionnement d'air. Ce document décrit la méthodologie de base d'une évaluation des paramètres microbiologiques principaux de l'eau des humidificateurs. Il pose les bases d'une standardisation des méthodes de prélèvements sur site et des traitements des résultats au laboratoire, et fournit une échelle de valeurs guide (centiles) permettant de situer le niveau de contamination de l'eau.

2. PRELEVEMENT SUR SITE

Pour les **germes revivifiables** recherchés, l'eau est prélevée à partir d'un système de 2 tuyaux stériles raccordés à un récipient en verre stérile de un litre mis en dépression avec une pompe. Cet échantillon permet la recherche des moisissures et bactéries ainsi que les mesures physico-chimiques tels que **pH** et **conductivité**, et de l'**ATP**.

Pour le dosage de l'**ergostérol**, le système de prélèvement est le même, mais les récipients de 0.5 l sont nettoyés avec de ...

Pour le dosage des **endotoxines**, l'eau est prélevée à partir d'une pipette de 50ml fixée sur un petite pompe. L'eau est ensuite versée dans un récipient de type Falcon, de 50 ml. Pipette et Falcon sont à usage unique et aprotogènes.

Le système de 2 tuyaux métalliques est placé de telle manière que le guide métallique touche le fond du bac. De cette façon, l'embout du premier tuyau est situé à 1 cm du fond du bac (récolte de l'eau avec d'éventuels dépôts) et le second tube à 5 cm du fond. (voir annexe)

3. GERMES RECHERCHES ET AUTRES PARAMETRES

- Les **moisissures mésophiles hygrophiles** (se développant à 25°C sur des matériaux très disponibles en eau libre ou a_w élevé). Parmi les espèces rencontrées, on trouve les espèces phytopathogènes dont l'origine est strictement extérieure (*Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea*, ...) et des espèces pouvant se développer à l'intérieur à des endroits présentant un humidité anormalement élevée (*Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus versicolor*, *Stachybotrys chartarum*, ...), voire dans l'eau (*Exophiala*).
- Les **Thermoactionomycètes se développant à 52°C**, sont des bactéries filamenteuses capables de se développer à des températures élevées. Les batteries chaudes à proximité des humidificateurs peuvent parfois en héberger des quantités élevées. Dans ce cas elles sont généralement retrouvées dans l'eau d'humidification
- Le dénombrement total des **bactéries se développant à 25°C sur TSA** sont en majorité des bactéries susceptibles de se développer dans l'environnement. Présentes en quantités élevées elles traduisent une contamination au niveau du site.
- Le dénombrement total des **bactéries se développant à 37°C sur TSA** sont en majorité des bactéries d'origine humaines. Présentes en quantités élevées dans un bâtiment, elle traduisent une ventilation insuffisante et/ou un environnement surpeuplé.
- Le dénombrement total des **bactéries Gram-** sont responsables de la présence des endotoxines dans l'environnement (la recherche de bactéries plus spécifiques sort du cadre de cette approche préliminaire)
- Les **endotoxines** sont constituées d'un fragment de paroi de bactéries Gram- et notamment du lipopolysaccharide (LPS); responsable de leurs propriétés toxiques. L'intérêt du dosage est double. En raison de leur toxicité propre d'une part et d'autre part, en tant que **biomarqueur bactérien Gram-**. Il faut préciser qu'il s'agit à la fois d'un bio-marqueur de la charge TOTALE des bactéries Gram-, revivifiable ou non. Il s'agit donc d'une mesure complémentaire aux analyses microbiologiques classiques
- L'**ergostérol** est le stérol membranaire majoritaire des levures et des champignons et est donc employé comme **biomarqueur fongique**. Comme pour les endotoxines, Il s'agit d'un biomarqueur de la charge TOTALE de la fonge, revivifiable ou non.
- L'**ATP**, en tant que molécule énergétique de base utilisées par tous les êtres vivants. L'ATP est donc un biomarqueurs de présence de vie (présente ou ancienne).

4. PROCEDURES DE LABORATOIRE : PRINCIPES GENERAUX

4.1. MISE EN CULTURE

4.1.1. Les bactéries

L'eau estensemencée par étalement sur du TSA. Les dilutions de base utilisées sont 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . 2 séries de boîtes sont préparées, l'une étant incubée à 37°C, l'autre à 25°C. Des dilutions supplémentaires peuvent être ajoutées suivant les cas.

4.1.2. Les moisissures

L'eau estensemencée par inclusion dans du MEA chloramphénicol que l'on verse (<50°C !!) sur l'échantillon. Les dilutions de base utilisées sont 5ml, 10, 10^{-1} , 10^{-2} . 2 séries de boîtes sont préparées, l'une étant incubée à 37°C, l'autre à 25°C. Des dilutions supplémentaires peuvent être ajoutées suivant les cas.

4.1.3. Les thermoactinomycètes

L'eau est filtrée sur 2 milliflex (0.45 μ m), à raison de respectivement 50 et 250ml. Les cassettes sont ensuite remplies avec du TSA + Actidione et misent dans une boîte étanche dont le fond est recouvert de papier absorbant humidifié. L'incubation se fait à 52°C pendant 2 jours.

Tableau 1 : Milieux de culture utilisés, températures et temps d'incubation

Germes	Milieux gélosés	t° incubation	Durée d'incubation
Moisissures totales hygrophiles	MEA chloramphénicol	25°C	5 jours 21 jours
Bactéries totales de l'environnement (*EnvB)	TSA (ou TSA Actidione)	25°C	5 jours
Bactéries totales d'origine humaine (*H-SB)	TC de Biotest	37°C	2 jours
Bactéries Gram-	Mac Conkey Agar	37°C	2 jours
Thermoactinomycètes	TSA novobiocine	52°C (humide)	2 jours

* *Abréviation des termes en anglais: EnvB: Mesophilic Environmental Bacteria; H-SB: Mesophilic Human-Source Bacteria - Voir fiches des milieux de culture ci-jointes*

4.2. DOSAGE DE L'ATP

L'ATP, en tant que molécule énergétique de base utilisées par tous les êtres vivants est utilisé en tant que biomarqueur lié à l'occurrence de matériel biochimique issu d'organismes vivants ou morts.

Test Hi-lyte.

4.3. DOSAGE DES ENDOTOXINES

Voir procédure [ISP/MYC/AC07](#)

4.4. DOSAGE DE L'ERGOSTEROL

Voir procédure [FUSAGx-ISP/AC08](#)

4.5. MESURE DU PH

Voir procédure interne

4.6. MESURE DE LA CONDUCTIVITE

Voir procédure interne

4.7. LES DEPOTS

4.7.1. Evaluation des dépôts

Absence : 0

Présence :

1 = dépôts ne couvrant pas l'entièreté du fond du flacon

2 = dépôts recouvrant l'entièreté du fond du flacon

4.7.2. Examen microscopique des dépôts : microfaune

Prélèvement dans les dépôts décantés avec une pipette stérile de 1ml, avec embout filtré. Trois répétitions à 3

endroits différents en prenant soin de vider la pipette après chaque opération

Observation directe : une goutte d'eau entre lame et lamelle. 3 fois

Absence : 0

Présence :

1, quand on a repéré au moins un individu au cours des 3 répétitions

2, quand on a de 2 à 5 individus sur la préparation au cours des 3 répétitions

3, quand on a plus de 5 individus sur la préparation au cours des 3 répétitions

4.8. COLORATION DE L'EAU

Absence= 0

Dans les autres cas, indiquer la couleur

5. LECTURE DES RESULTATS POUR LES GERMES REVIVIFIABLES

5.1. Les bactéries

Un dénombrement total des colonies est effectué après l'incubation.

5.2. Les moisissures

Un dénombrement total des colonies est effectué après une incubation de 5 jours et les colonies sont pointées sur le couvercle en prenant soin de tracer un repère sur le bord de la boîte de Pétri de manière à toujours replacer le couvercle dans la même position. Les boîtes sont ensuite replacées en incubation. Le 21ème jour après l'ensemencement, les colonies sont recomptées et identifiées.

5.3. Les thermoactinomycètes

Un dénombrement total des colonies est effectué après l'incubation. Les *Thermoactinomyces spp.* sont ensuite repiqués sur TSA+amidon et incubé 2 jours à 52°C selon la même procédure que pour l'isolation. Ce test amidon différencie les *T. vulgaris* des *T. candidus*.

5.4. Notion de confluence : lorsque le nombre de colonies est fort élevé, il arrive que le dénombrement manque d'exactitude ou soit impossible, les colonies étant intriquées les unes dans ou sur les autres. On parle alors de confluence. Dans ce cas, il faut recommencer en ajoutant une ou plusieurs dilutions.

5.5. Notion d'envahissement : certaines espèces ont la particularité d'envahir les boîtes de culture en moins de 5 jours, ce qui empêche le dénombrement des colonies avec exactitude. Avec certaines espèces très denses une évaluation minimum des espèces sous-jacentes est rendue impossible (*Trichoderma*) : dans ce cas, on indique uniquement le nom de l'espèce envahissante, en indiquant E.

5.6. Notion de présence : lorsque une espèce est détectée parmi beaucoup d'autre, on signale seulement sa présence par un +

6. GUIDELINES UTILISEES PAR L'ISP

Eau humidificateur - Conductivité	
Centiles	µS/cm
5	85
25	620
50	824
75	1135
95	2470

Eau humidificateur - pH	
	unité pH
Moyenne	8,35
Ecart type	1,06
Min :	4,25
Max :	10,77

Eau humidificateur - Bactéries à 25°C – CFU/ml		
Centile	Valeurs calculées	Valeurs arrondies
5	110	100
25	3.700	5.000
50	23.000	25.000
75	165.500	200.000
95	1.887.000	2.000.000

Eau humidificateur - Bactéries à 37°C – CFU/ml		
Centile	Valeurs calculées	Valeurs arrondies
5	0	0
25	63	50
50	600	500
75	8.825	10.000
95	590.000	500.000

Eau humidificateur – Moisissures à 25°C – CFU/ml

Centile	Valeurs calculées	Valeurs arrondies
5	0	
25	2	
50	11	10
75	63	50
95	548	500

D'un point de vue qualitatif, les moisissures identifiées dans 417 humidificateurs appartiennent majoritairement aux genres :

Exophiala spp. (44%), *Acremonium spp.* (37%), *Phoma spp.* (17%), *Phialophora spp.* (9%), *Black Yeast* (7%), *Fusarium spp.* (6%) (voir §8)

Eau humidificateur - ATP – unités de luminescence

Centile	Valeurs calculées	Valeurs arrondies
5	18	20
25	250	250
50	680	700
75	2.300	2.500
95	9.000	10.000

Centiles Ergostérol

	Ergostérol	
	Dépôts	Eau
25	-	-
50	0.9	-
75	3	30 < E > 90
90	5.5	150 < E > 490
	µg/g	ng/l

Une échelle provisoire « de propreté » est constituée sur base des centiles 50, 75 et 90/95, qui peut constituer un outil d'aide à la prise de décision pour les responsables de la maintenance quant aux attitudes préventives ou curatives à mettre en œuvre.

Proposition d'un outil d'aide à la décision en cas de contaminations microbiologiques de l'eau d'un humidificateur

entre 0 et 75	état jugé satisfaisant sur le plan fongique
entre 75 et 95	à surveiller; reprise d'un échantillon 15j après une maintenance
supérieur à 95	identifier et solutionner le problème 15j après une maintenance complète

Le brassicastérol

Les levures noires appartenant aux genres *Exophiala sp.* et *Phialophora* sont parmi les plus fréquentes dans les humidificateurs. Une analyse approfondie des stérols constitutifs de 12 souches d'*Exophiala jeansmei* a conduit à la mise en évidence, en plus de l'ergostérol, d'une molécule indicatrice : le **brassicastérol**.

Eau humidificateur - Endotoxines

Centile	Valeurs calculées	Valeurs arrondies retenues
25	18	
50	46	50
60	75	
70	107	100
75	146	
90	298	
95	549	>500
En unités UE/ml (Unités d'Endotoxines par ml) 10 UE/ml = 1 ng/ml		

Proposition d'un outil d'aide à la décision en fonction de la concentration en endotoxines mesurées dans l'eau d'un humidificateur

<50 UE/ml	état jugé satisfaisant
>50 et <100 EU/ml	à surveiller; reprise d'un échantillon 15j après une maintenance
>100 et <500 UE/ml	Mesures correctives à prendre rapidement reprise d'un échantillon 15j après une maintenance
>500 UE/ml	Mesures correctives immédiates

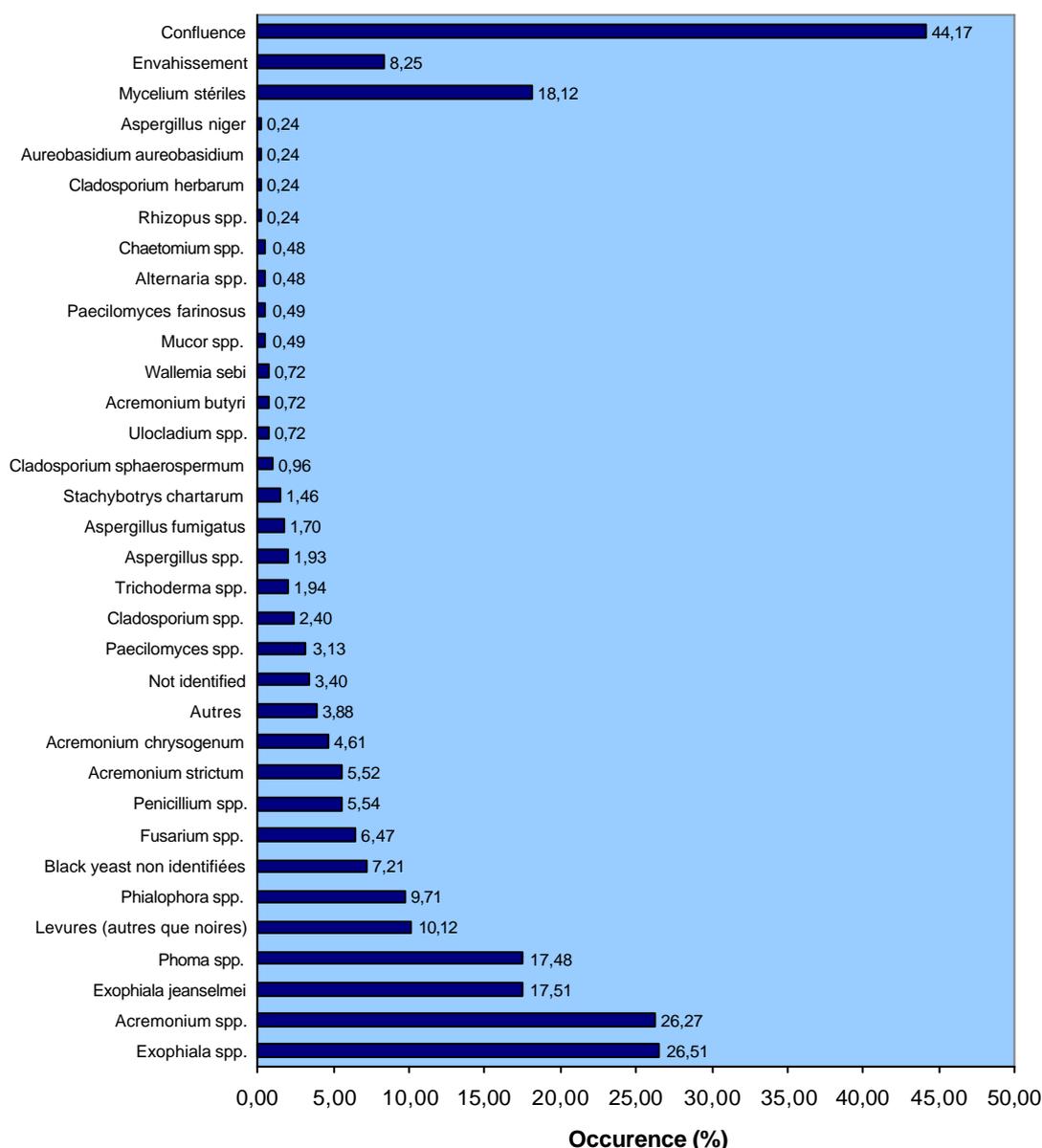
8. LIMITES D'INTERPRETATION

Il faut rappeler que les résultats obtenus à partir des milieux gélosés concernent uniquement des moisissures encore viables, capables de se développer sur les milieux de culture choisis, et aux températures d'incubation utilisées.

Il est également important de préciser que les niveaux de qualité choisis ne sont pas corrélés avec un niveau de risque pour la santé. Toutefois le principe de précaution doit être appliqué en cas de contaminations élevées.

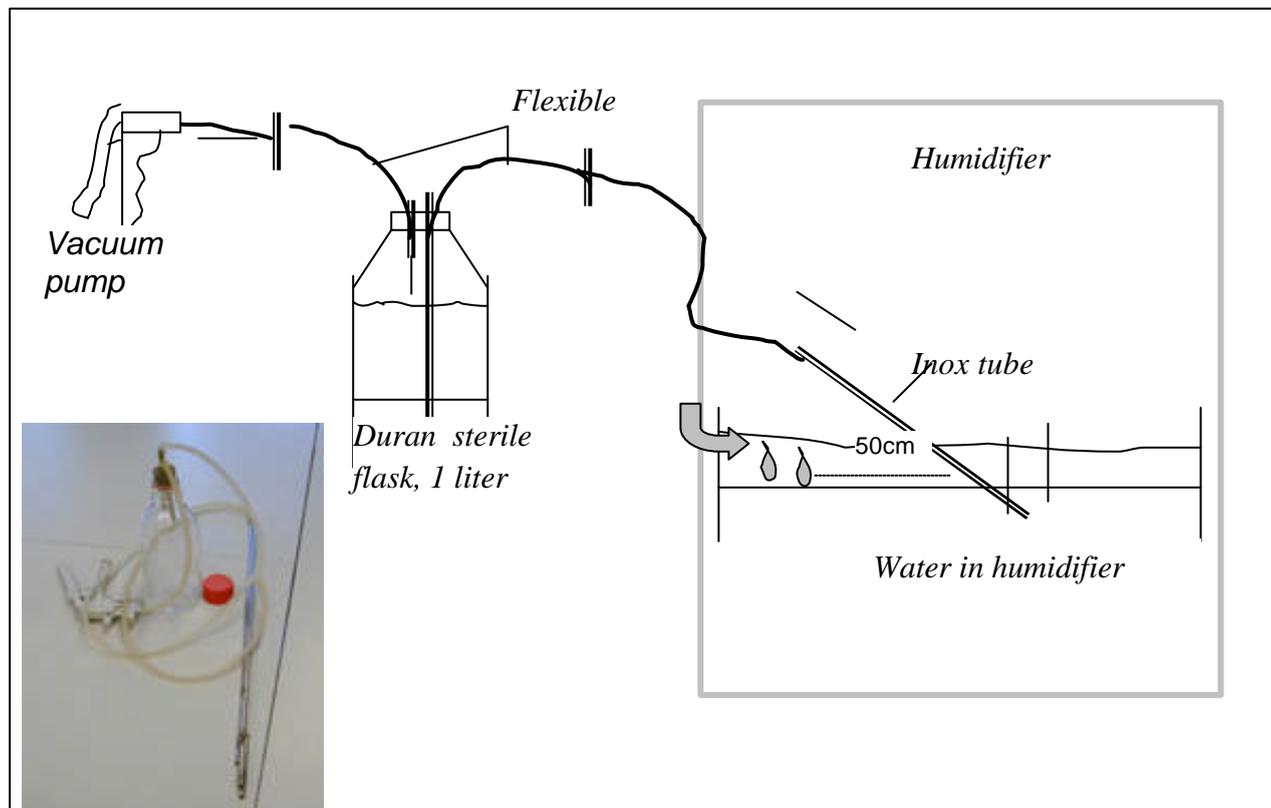
L'échelle de centiles donnée au §7 n'a pour objectif que de se situer par rapport à d'autres humidificateurs dans des bâtiments similaires ce qui peut constituer un outil d'aide à la prise de décision pour les responsables de la maintenance quant aux attitudes préventives ou curatives à mettre en œuvre. Pour un diagnostic plus approfondi, et notamment lors d'une enquête en relation avec des problèmes de santé, **l'identification des germes est indispensable, et particulièrement pour les moisissures capables de s'amplifier dans l'eau.**

Occurrence des moisissures isolées dans l'eau de 417 humidificateurs



ANNEXES 1: COMPOSITION DES MILIEUX GELOSES DE BASE UTILISES

Malt extract agar + chloramphenicol (MC)	malachite green + 2.5 ppm + chloram (MGA 2.5)	Tripticase Soy Agar (TSA)
Malt extract 20 g Bacto peptone 1 g Dextrose 20 g Chloramphenicol 0,5 g MgSO ₄ .7H ₂ O 0,5 g KH ₂ PO ₄ 0,5 g Pastagar 15 g Solution d'Oligoéléments* 1 ml Eau ultra pure 1 L	Bacto peptone 15 g Chloramphenicol 0,5 g MgSO ₄ .7H ₂ O 0,5 g KH ₂ PO ₄ 1 g Malachite green oxalate* 100 ml Bacto agar 20 g Eau ultra pure 900 ml	Bacto tryptone 15 g Bacto soytone 5 g NaCl 5 g Pastagar 15 g Eau ultra pure 1 L
*Solution Oligo-éléments	Tripticase Soy Agar + cycloheximide (TSA act)	Tripticase Soy liquid medium + Novobiocine (TSB novo)
H ₃ BO ₃ 58 mg CuCl ₂ .2H ₂ O 270 mg MnCl ₂ .4H ₂ O 78 mg ZnCl ₂ 4,2 g Ammonium molybdate 0,2%* 18 ml FeCl ₂ .4H ₂ O* 714 mg Eau ultra pure 1 L	Bacto tryptone 15 g Bacto soytone 5 g NaCl 5 g Cycloheximide* 100 mg Pastagar 15 g Eau ultra pure 1 L *Cycloheximide = Actidione	Bacto tryptone 15 g Bacto soytone 5 g NaCl 5 g Eau ultra pure 1 L + Novobiocine 0.1gr/l Tripticase soy agar + Amidon + Amidon: 10 mg/L
MacConkey Agar		
MacConkey Agar 52 g Eau ultra pure 1 L		

ANNEXES 2: MATERIEL ET UTILISATION


A l'aide d'une pompe aspirante, le vide est réalisé dans le flacon de 1 litre stérile. Un tuyau en silicone terminé par une double tige en inox, le tout stérile, permet de prélever l'eau dans les meilleures conditions.



**14, rue Juliette Wytsman
B-1050-Bruxelles**

Section de Mycologie
Chef de Section: Dr Sc. N. Nolard
e-mail : n.nolard@iph.fgov.be

Contact: Unités Environnements Intérieurs

Responsable: Dr Sc Camille Chasseur
e-mail : c.chasseur@iph.fgov.be

Communication : Clarissa Spencer
e-mail : c.spencer@iph.fgov.be

tél. + 32 (0)2 642 52 12 (mardi et jeudi de 9h30-16h30)
Fax : + 32 (0)2 642 55 19

WEB-SITE de l'ISP-Mycologie: <http://www.indoorpol.be>

Support Scientifique du SSTC

1. OBJECTIFS

L'unité Environnement de la Section Mycologie à l'ISP s'est spécialisée dans les interventions et les analyses microbiologiques dans les bâtiments à bureaux. Ce document décrit la méthodologie de base d'une évaluation fongique totale. Il pose les bases d'une standardisation des méthodes de prélèvements sur site et des traitements des résultats au laboratoire, et fournit des valeurs guide permettant de situer le niveau de contamination du bâtiment.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel: un aspirateur de 1200W équipé d'un embout porte filtre. Filtre « 3M filtrete », (MC/US/diam 57 mm/PB). Le filtre est préalablement pesé.

2.2. Prélèvements la poussière est aspirée pendant 2 minutes sur une surface de 1m².

3. PROCEDURES DE LABORATOIRE :

Au laboratoire, le filtre est repesé après échantillonnage. La différence donne le poids de poussière récoltée. Une solution aqueuse stérile de tween 80 (0,02%) est ajoutée de manière à fixer la concentration de départ à 10⁻² (par exemple, à 0.492 gr. de poussière, on ajoute 49.2 ml de solution). L'ensemble est ensuite agité à vitesse modérée (agitateur latéral) pendant 20 minutes à température ambiante. L'ensemencement sur milieux gélosés adéquats est effectué par dilutions successives (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵) et les boîtes sont ensuite incubées.

4. GERMES RECHERCHES:

Germs recherchés systématiquement

- Les **moisissures mésophiles hygrophiles** (isolées à 25°C et se développant sur des matériaux très disponibles en eau libre avec un aw élevé). Parmi les espèces rencontrées, on trouve les espèces phytopathogènes dont l'origine est strictement extérieure (*Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea*, ...) et des espèces pouvant se développer à l'intérieur à des endroits présentant une humidité anormalement élevée (*Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus versicolor*, *Stachybotrys chartarum*, ...)
- Les **moisissures mésophiles xérophiles** (isolées à 25°C et se développant sur des matériaux peu disponibles en eau libre avec un aw faible). Parmi les espèces xérophiles, le genre *Penicillium* ou *Aspergillus* (*A. glaucus* gr.) sont les plus fréquemment isolés à l'intérieur des bâtiments.

Autres germes recherchés en priorité

- Les moisissures thermophiles (isolées à 45°C).
- Le dénombrement total des bactéries « environnementales » se développant sur TSA à 25°C
- Le dénombrement total des bactéries « d'origine humaine » se développant sur TSA à 37°C
- Le dénombrement total des bactéries Gram- (à 37°C)

5. MILIEUX DE CULTURE, INCUBATION

Milieux de culture utilisés, températures et temps d'incubation en fonction des germes recherchés (poussière)

Germs	Milieux gélosés	t° incubation	Durée incubation
Moisissures totales mésophiles hygrophiles	MC	25°C	7 jours
Moisissures totales mésophiles xérophiles	M40Y et M40Y + NaCl	25°C	7 jours
Moisissures totales thermophiles	MC	45°C	2 jours
Bactéries totales « environnementales »	TSA	25°C	5 jours
Bactéries totales « d'origine humaine »	TSA	25°C	2 jours
Bactéries Gram-	Mac Conkey	37°C	2 jours

Voir fiches des milieux de culture ci-jointes

6. LECTURE DES RESULTATS

Notion de confluence : lorsque le nombre de colonies est fort élevé, il arrive que le dénombrement manque d'exactitude ou soit impossible, les colonies étant intriquées les unes dans ou sur les autres. On parle alors de confluence. Dans ce cas, il faut recommencer en ajoutant une ou plusieurs dilutions.

Notion d'envahissement : certaines espèces ont la particularité d'envahir les boîtes de culture avant la fin du temps d'incubation, ce qui empêche le dénombrement des colonies avec exactitude. Avec certaines espèces très denses une évaluation minimum des espèces sous-jacentes est rendue impossible (*Trichoderma*) : dans ce cas, on indique uniquement le nom de l'espèce envahissante, en indiquant E.

7. GUIDELINES ISP-MYCOLOGIE

Les moisissures

239 échantillons de poussières ont été analysés sur le plan fongique à l'ISP. Les résultats nous ont permis de recalculer les valeurs centiles. 90 % des échantillons analysés se situaient sous le seuil de 100 CFU/mg calculé précédemment. Moins de 5% présentaient des valeurs excessivement élevées révélant une contamination sérieuse.

Moisissures	Mésophiles	Xérophiles	Xérophiles
Milieu gélosé	MEA Chloramphénicol	M40Y	M40Y+NaCl
5	1	2	1
25	6	5	2
50	12	10	5
75	37	24	12
85	60	50	24
90	100	72	47
95	223	166	79
Maximum	1800	600	700
En CFU/mg de poussière tamisée			
N	239	209	209

8. LIMITES D'INTERPRETATION

Il faut rappeler que les résultats obtenus de cette manière concernent uniquement des moisissures encore viables et capables de se développer sur les milieux gélosés choisis, aux températures d'incubation utilisées.

Il est également important de préciser que les niveaux de qualité choisis ne sont pas corrélés avec un niveau de risque pour la santé. Toutefois le principe de précaution peut être appliqué en cas de contaminations élevées.

L'échelle de centiles donnée au §7 n'a pour objectif que de se situer par rapport à d'autres bâtiments similaires. Pour un diagnostic plus approfondi, et notamment lors d'une enquête en relation avec des problèmes de santé, **l'identification des germes est indispensable, et particulièrement pour les moisissures lorsque l'on dépasse des valeurs supérieures à 100 CFU/mg.**

9. REFERENCES

Prevalence of fungi in carpeted floor environment: analysis of dust samples from living-rooms, bedrooms, offices and school classrooms.

Beguín, H., Nolard. *Aerobiologia*, 1996, 12, 2: 113-120.

ANNEXES 1: COMPOSITION DES MILIEUX GELOSES DE BASE UTILISES

Malt extract agar + chloramphenicol (MC)		M40Y		M40Y NaCl	
Malt extract	20 g	Malt extract	20 g	Malt extract	20 g
Bacto peptone	1 g	Yeast extract	5 g	Yeast extract	5 g
Dextrose	20 g	Saccharose	400 g	Saccharose	400 g
Chloramphenicol	0,5 g	MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,5 g	NaCl	50 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g	KH ₂ PO ₄	0,5 g	MgSO ₄ 7 H ₂ O	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g	Bacto agar	20 g	KH ₂ PO ₄	0,5 g
Pastagar	15 g	Oligo-éléments	1 ml	Bacto agar	20 g
Solution d'Oligoéléments *	1 ml	Eau ultra pure	1 L	Oligo-éléments	1 ml
Eau ultra pure	1 L			Eau ultra pure	1 L
*Solution Oligo-éléments		Tripticase soy agar (TSA)		MacConkey Agar	
H ₃ BO ₃	58 mg	Bacto tryptone	15 g	MacConkey Agar	52 g
CuCl ₂ .2H ₂ O	270 mg	Bacto soytone	5 g	Eau ultra pure	1 L
MnCl ₂ .4H ₂ O	78 mg	NaCl	5 g		
ZnCl ₂	4,2 g	Pastagar	15 g		
Ammonium molybdate 0,2%*	18 ml	Eau ultra pure	1 L		
FeCl ₂ .4H ₂ O *	714 mg	Tripticase soy agar + cycloheximide (TSA + act)			
Eau ultra pure	1 L	TSA + Cycloheximide* ♂	100 mg		
		*Cycloheximide = Actidione			

ANNEXES 2 : MATERIEL ET ECHANTILLONNAGE



1. Embout spécial porte filtre utilisé par l'ISP-Mycologie



2. Ouverture de l'embout avant l'échantillonnage



3. Filtre « 3M filtrete », (MC/US/diam 57 mm/PB)



4. Mise en place du filtre dans l'embout



5. Mise en place du filtre dans l'embout



6. Fermeture de l'embout



7. Echantillonnage (1200W, 2 minutes, 1 m²) →



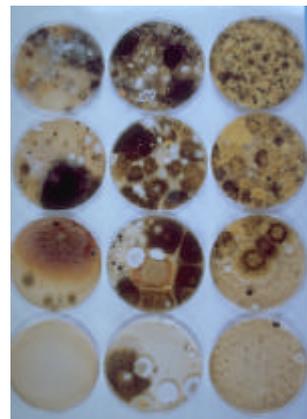
8. Le filtre est retiré de l'embout après l'échantillonnage



9. Le filtre et la poussières sont remis dans le sac en plastique



10. Au laboratoire, la poussière estensemencée
11. Le développement → d'une fonge tantôt hygrophile tantôt xérophile permet de choisir les méthodes correctives les plus adéquates



**14, rue Juliette Wytsman
B-1050-Bruxelles**

Section de Mycologie

Chef de Section: Dr Sc. N. Nolard
e-mail : n.nolard@iph.fgov.be

Contact: Unité Environnements Intérieurs

Responsable: Dr Sc Camille Chasseur
e-mail : c.chasseur@iph.fgov.be

Communication : Clarissa Spencer
e-mail : c.spencer@iph.fgov.be

tél. + 32 (0)2 642 52 12 (mardi et jeudi de 9h30-16h30)
Fax : + 32 (0)2 642 55 19

WEB-SITE de l'ISP-Mycologie: <http://www.indoorpol.be>

Support Scientifique du SSTC

1. OBJECTIFS

L'unité Environnement de la Section Mycologie à l'ISP s'est spécialisée dans les interventions et les analyses microbiologiques dans les bâtiments à bureaux équipés de conditionnement d'air. Ce document décrit la méthode de dosage des endotoxines utilisée pour l'eau des humidificateurs. Il pose les bases d'une standardisation des méthodes de prélèvements sur site et des traitements des résultats au laboratoire, et fournit une échelle de valeurs guide (centiles) permettant de situer le niveau de contamination de l'eau. Cette fiche peut être complémentaire à la fiche ISP/MYC/AC05

2. DEFINITION ET PRELEVEMENT SUR SITE

Les endotoxines sont des lipopolysaccharide (LPS) constitutifs de la paroi des bactéries Gram-; et sont pour une part responsables de leurs propriétés toxiques. L'intérêt du dosage est double : En raison de leur toxicité propre d'une part et d'autre part, en tant que bio-marqueur bactérien Gram-.

Pour le dosage des **endotoxines**, l'eau est prélevée à partir d'une pipette de 50ml fixée sur un petite pompe. L'eau est ensuite versée dans un récipient de type Falcon, de 50 ml. Pipette et Falcon sont à usage unique et apyrogènes.

3. METHODE

Réactifs :

- ✓ Kit chromogénique Pyrochrome comprenant :
 - Le réactif LAL (lysate d'amœbocytes de limule) sous forme de préparation lyophilisée et contenant un extrait aqueux d'amœbocytes de *Limulus polyphemus*, du dextran (stabilisateur), de l'EDTA, CaCl₂, MgCl₂, un tampon et un substrat chromogénique (Boc-Leu-Gly-Arg-p-nitroaniline).
 - Le tampon de reconstitution du LAL : 4 ml Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane HCl 0,2 M (n° lot : BU0101).
 - L'endotoxine de référence (Control Standard Endotoxin CSE) *Escherichia Coli O113 : H10*, à une concentration de 2 UE/ml

Remarque : le kit d'essai pour la réalisation du test LAL avec couplage diazoté contient en outre un flacon d'HCl, un flacon de nitrite de sodium, un flacon de sulfamate d'ammonium et un de N-1-naphtyléthylènediamine (NEDA).

- ✓ Eau apyrogène ACILA LRW (LAL Reagent Water, teneur en endotoxines certifiée inférieure à 0,001 UE/ml).

Matériel :

- ✓ Tubes en verre pour dilutions, rendus apyrogènes après chaque utilisation par traitement thermique au four à mouffles
- ✓ Hotte à flux laminaire.
- ✓ Agitateur type Vortex (Genie ; modèle K-550-GE).
- ✓ Micropipettes calibrées (10 – 100 µl, 50 – 200 µl, 100 – 1 000 µl) avec pointes apyrogènes (tips), à usage unique.
- ✓ Microplaque (96 puits) apyrogène (EL 312 e Microplaque), à fond plat et avec couvercle
- ✓ Etuve
- ✓ Incubateur (37°) lecteur de microplaques permettant une lecture soit à 405 nm soit à 545 nm (cas de la diazotation).
- ✓ Ordinateur avec un logiciel (KCjunior) de pilotage du lecteur, de recueil des données et de calcul des résultats.

Etablissement d'une droite d'étalonnage

Les blancs : cinq blancs (BLK) sont préparés en ajoutant 5 x 400 µl d'eau apyrogène dans cinq tubes en verre apyrogènes. Ces blancs permettent de contrôler simultanément la qualité de l'eau apyrogène et l'efficacité du barème température-temps appliqué à la verrerie.

Les dilutions de l'endotoxine de référence : 500 µl d'eau apyrogène sont ajoutés au flacon contenant l'endotoxine de référence (2 UE/ml), de manière à obtenir une solution mère à 4 UE/ml (STD 0) ; après agitation suffisante (une minute au moins) au Vortex, le contenu du flacon est transvasé immédiatement dans un tube en verre apyrogène. A partir de cette solution mère (4 UE/ml), les solutions standards sont préparées :

Toutes ces dilutions sont effectuées avec la micropipette (10 – 100 µl), en changeant de tips à chaque dilution, et « vortexées » pendant minimum 30 secondes.

Le remplissage de la microplaque : le remplissage de la microplaque (50 µl dans chacun des puits) est réalisé en partant de la solution la moins concentrée (le blanco en B₂ jusque B₆) jusqu'à la solution la plus concentrée (2 UE/ml de E₇ à E₁₁),

Comme le préconise Rinjart et al. [1994], nous évitons dans un premier temps d'utiliser les puits externes afin d'éliminer les problèmes de perte de chaleur et/ou de contamination éventuelle lors de la manipulation de la microplaque.

L'ajout du LAL : un volume de 50 µl de réactif LAL (reconstitué par 3,2 ml du tampon de reconstitution) est ajouté le plus rapidement possible à chacun des puits, afin d'obtenir une proportion 1 : 1 (endotoxine standard : LAL).

La lecture des densités optiques à l'incubateur lecteur de microplaques : pour les méthodes chromogéniques cinétiques, la microplaque est insérée dans l'incubateur lecteur de microplaques réglé à 37°C. Le logiciel KCJunior permet de programmer une forte agitation de la microplaque pendant 30 secondes avant que les lectures d'absorbance à 405 nm de chacun des puits ne soient réalisées toutes les 30 secondes pendant une heure.

Pour la méthode chromogénique « point final » à 405 nm, la microplaque est placée dans une étuve thermostatée à 37°C pendant précisément 15 minutes (notice du fabricant des kits Pyrochrome) puis la réaction est stoppée par 50 µl d'acide acétique à 50 %. La lecture de densité optique est alors réalisée à 405 nm au spectrophotomètre. Pour la méthode chromogénique « point final » avec couplage diazoté, après précisément 37 minutes d'incubation (notice du fabricant des kits Pyrochrome), on arrête la réaction enzymatique avec 50 µl de nitrite de sodium reconstitué au HCl. Puis on ajoute respectivement 50 µl de sulfamate d'ammonium et 50 µl de NEDA tous deux reconstitués avec 4 ml d'eau distillée. Une couleur magenta se développe alors assez rapidement et on lit le test à 545 nm.

Le dosage des endotoxines dans les eaux d'humidificateurs

Un blanco et une droite d'étalonnage construite à partir de trois standards (1 UE/ml ; 0,25 UE/ml et 0,0625 UE/ml) sont systématiquement réalisés sur chacune des microplaques entamées. Toutes les eaux reçues ont été diluées 10 x, 100 x, 1 000 x et 10 000 x par de l'eau apyrogène (prise d'essai : toujours 200 µl). Chacune des trois dilutions de standard et de chaque eau est analysée en double sur la microplaque : six puits sont donc requis pour la construction de la droite d'étalonnage et huit pour le dosage de chaque eau.

4. CONSERVATION DES ECHANTILLONS

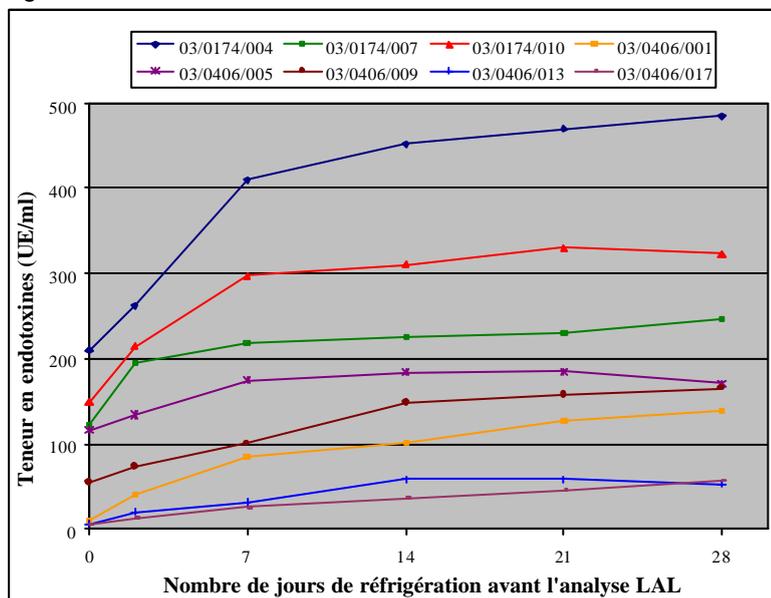
Effet de la réfrigération des eaux sur leur teneur en endotoxines

L'évolution des teneurs en endotoxines de huit eaux réfrigérées (03/0174/004,7,10 et 03/0406/001,5,9,13,17 ; température : 4°C) a été entreprise.

Pour chacune de ces eaux, le dosage des endotoxines, par la méthode LAL chromogénique basée sur le temps de réaction pour atteindre une densité optique de 0,3, a été effectué de manière similaire après un week-end, une semaine, deux semaines, trois semaines et un mois de réfrigération.

Les résultats obtenus sont repris sous forme de graphique dans la figure 1.

Figure 1



De manière générale, on observe, au cours du temps, un accroissement assez significatif de la teneur en endotoxines (UE/ml) des eaux. Cette tendance se marque principalement au terme de la première semaine de réfrigération où les teneurs en endotoxines retrouvées peuvent déjà être augmentées d'un facteur 8 par rapport aux teneurs initiales.

Au cours des trois semaines restantes, on observe que les teneurs en endotoxines finissent par atteindre un palier, sans doute du à l'effet de la réfrigération qui ralentit la croissance des bactéries Gram-négatives présentes dans les eaux.

Au terme de l'analyse, c'est-à-dire donc après un mois de réfrigération, il apparaît que les teneurs en endotoxines des eaux dépassent de 1,5 à 14 fois celles de départ.

Comme on le voit, ce coefficient multiplicatif variant très fortement d'un échantillon à l'autre, cela contraint à conclure **que le dosage des endotoxines dans les eaux par la méthode LAL ne fournit des valeurs correctes que s'il est réalisé le plus tôt possible après prélèvement (et dans le cas bien sûr où une congélation n'est pas envisagée).**

Effet de la congélation des eaux sur la teneur en endotoxines

Les mêmes eaux qu'au paragraphe précédent ont servi à tester, d'une manière générale, l'effet de la congélation des eaux d'humidificateurs (température : - 20°C) sur leur teneur en endotoxines (UE/ml), mesurée à nouveau par la méthode cinétique du test LAL.

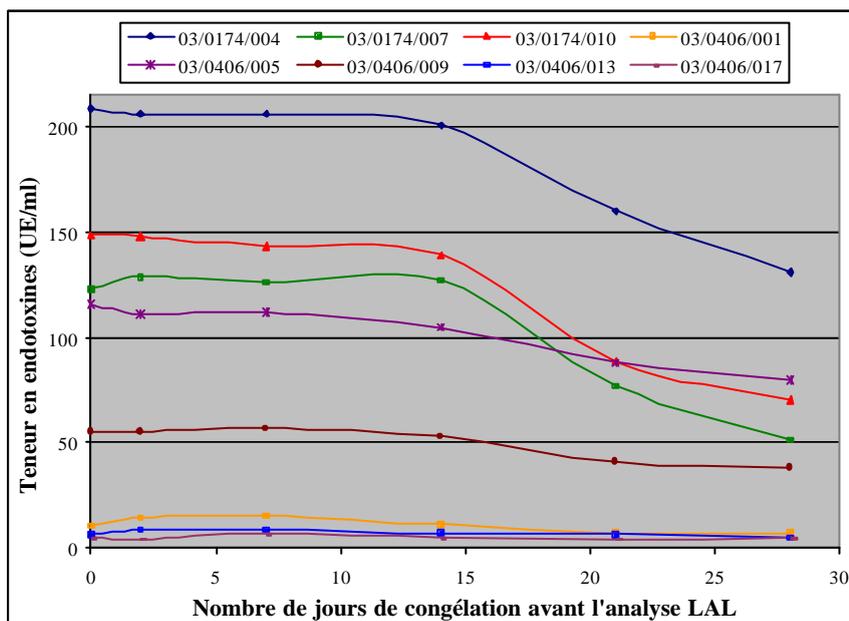
Les dosages d'endotoxines sont de nouveau réalisés après un week-end, une semaine, deux semaines, trois semaines et un mois de congélation.

Les résultats sont repris sur le graphique de la figure 2.

L'élément primordial à mettre en évidence concerne la constance remarquable des teneurs en endotoxines des eaux au cours des deux premières semaines de congélation. Sur la figure 2, ce fait se marque clairement pour l'ensemble des eaux étudiées, par les plateaux observés jusqu'à deux semaines.

La période qui a suivi révèle par contre une diminution assez nette des teneurs en endotoxines retrouvées. La perte maximum observée est de 59 % (par rapport à la teneur initiale) et concerne l'échantillon 03/0174/007.

Figure 2



En conclusion, les échantillons ne sont jamais conservés au frigo. Ils sont immédiatement congelés et analysés dans les 15 jours.

6. GUIDELINES UTILISEES PAR L'ISP-MYCOLOGIE ET LA FUSAGX

Eau humidificateur - Endotoxines		
Centile	Valeurs calculées	Valeurs arrondies retenues
25	18	
50	46	50
60	75	
70	107	100
75	146	
90	298	
95	549	>500
En unités UE/ml (Unités d'Endotoxines par ml) 10 UE/ml = 1 ng/m		

Proposition d'un outil d'aide à la décision en fonction de la concentration en endotoxines mesurées dans l'eau d'un humidificateur	
<50 UE/ml	état jugé satisfaisant
>50 et <100 EU/ml	à surveiller; reprise d'un échantillon 15j après une maintenance
>100 et <500 UE/ml	Mesures correctives à prendre rapidement reprise d'un échantillon 15j après une maintenance
>500 UE/ml	Mesures correctives immédiates

8. LIMITES D'INTERPRETATION

Il est important de préciser que les niveaux de qualité choisis ne sont pas corrélés avec un niveau de risque pour la santé. Toutefois le principe de précaution doit être appliqué en cas de contaminations élevées.

9. REFERENCES

Mesure des endotoxines et des métabolites fongiques dans des lieux de travail en relation avec les risques pour la santé humaine

Mémoire de fin d'étude présenté par Hanon Emilien (2003)

Promoteurs: M. Marlier, G. Lognay

Unité de Chimie générale et organique - Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux

Section de Mycologie - Institut Scientifique de Santé Publique

10. PARTENAIRES

Les mises au point, les validations et le calcul de l'échelle provisoire de centiles ont été effectuées avec l'aide du laboratoire de Chimie Générale et Organique de la FUSAGx



**14, rue Juliette Wytsman
B-1050-Bruxelles**

Section de Mycologie

Chef de Section: Dr Sc. N. Nolard

e-mail : n.nolard@iph.fgov.be

Contact: Unité Environnements Intérieurs

Responsable: Dr Sc Camille Chasseur

e-mail : c.chasseur@iph.fgov.be

Communication : Clarissa Spencer

e-mail : c.spencer@iph.fgov.be

tél. + 32 (0)2 642 52 12 (mardi et jeudi de 9h30-16h30)

Fax : + 32 (0)2 642 55 19

WEB-SITE de l'ISP-Mycologie: <http://www.indoorpol.be>

Support Scientifique du SSTC

1. OBJECTIFS

L'unité Environnement de la Section Mycologie à l'ISP en collaboration avec l'unité de Chimie Générale et Organique (FUSAGx) s'est spécialisée dans les analyses microbiologiques et biochimiques dans les bâtiments à bureaux équipés de conditionnement d'air. Le présent document décrit la méthodologie de base visant à la quantification de l'ergosterol (molécule stérolique caractéristique des moisissures et des levures) en vue de mesurer la fonge totale: vivante/revivifiable ou morte (débris cellulaires). Il pose les bases d'une standardisation des méthodes de prélèvements sur site et d'analyse en laboratoire et fournit une échelle de valeurs guide (centiles) permettant de situer le niveau de contamination de l'eau. L'évaluation des concentrations en ergostérol en tant que biomarqueur viennent en appui des analyses mycologiques.

2. PRELEVEMENT SUR SITE

Pour les eaux des humidificateurs dans les bâtiments équipés de la climatisation, des prises d'essais sont effectuées dans les bacs. Deux flacons stériles d'un litre chacun sont remplis avec les eaux du même bac (l'un pour l'analyse de l'ergostérol et l'autre pour l'analyse mycologique toujours réalisée en parallèle Procédure ISP/MYC/AC05); un troisième flacon est rempli avec les dépôts se trouvant dans le fond du bac. Après réception, les échantillons sont stockés en chambre froide à 4°C.

Le flacon contenant les eaux exemptes de dépôts est homogénéisé et est réparti en deux échantillons en guise de répétitions et celles-ci sont filtrées sur une membrane filtrante (Millipore 0,8µm ATTP CAT NO. ATTP04700) montée sur dispositif de trompe à eau permettant d'accélérer l'opération. Les deux filtres sont insérés dans deux tubes différents et stockés au réfrigérateur.

Le troisième flacon contenant les dépôts est aussi filtré sur une membrane filtrante (Millipore 0,8µm ATTP CAT NO. ATTP04700). Deux prises d'essais de maximum 500mg (suivant l'abondance des dépôts retenus sur les filtres) sont effectuées en vue de calculer la matière sèche (110°C jusqu'à un poids constant). Trois prises d'essais d'environ analytiques dont la masse est déterminée avec une précision de 0.1 mg sont effectuées et placées dans trois tubes à essais stockés au frigo à 4°C à l'abri de la lumière.

3 PROCEDURE D'ANALYSE

3.1 Saponification-Extraction de l'ergosterol

L'ergosterol étant inclus dans des bicouches lipidiques et potentiellement présent sous forme d'esters, la libération de la molécule nécessite obligatoirement une saponification des échantillons par une base forte suivie d'une extraction sélective par solvant. extraction

- Saponification assistée par micro-ondes (EAM): ajout de 2ml de méthanol dans chaque tube puis de 2 ml d'une solution méthanolique 4M NaOH. Passage des échantillons (enfermés dans un récipient hermétique en plastique) aux micro-ondes (40% de la puissance (400W) pendant 30 secondes).
- Après refroidissement de la solution alcoolique saponifiée, ajouter 2 ml d'une solution de cholesterol de référence dans le n-hexane. (La solution de cholestérol est préparée comme suit : peser environ exactement 15 mg de cholestérol dans un ballon jaugé de 50ml complété au trait de jauge par du n-hexane (Solution STOCK) la solution de REFERENCE dont il est question ci-dessus est obtenue en diluant 100 fois la solution STOCK à l'aide de n-hexane
- Agiter pendant 5 minutes puis laisser reposer quelques minutes pour casser l'émulsion; ensuite récolter le surnageant dans un ballon piriforme de 10 ml à l'aide d'une pipette Pasteur. Ajouter 3 ml de n-hexane dans chaque tube de saponification (Rinçage n°1), agiter et laisser reposer quelques minutes pour casser l'émulsion. Ajouter le surnageant dans un ballon puis effectuer un 2ème rinçage avec 2ml d'hexane. Les extraits hexaniques sont ensuite évaporés sous vide à 35°C.
- Si les échantillons ne peuvent être analysés directement, ils doivent être conservés à -18°C à l'abri de la lumière.

3.1 Dosage GCMS ou CPG de l'ergosterol

3.1.1. Note liminaire

Le dosage de l'ergosterol par GC-MS ou CPG a une double vocation : l'identification certaine de la molécule (principalement dans le cas de la GCMS) et le dosage de cette dernière à l'aide du cholestérol considéré comme étalon interne. De plus, la détection du brassicastérol (molécule spécifique d'un nombre restreint de

souches des environnements aqueux) renseigne sur l'occurrence de *Exophiala jeanselmii*. En cas de très faibles concentrations la GC-MS sera préférentiellement utilisée en mode fragmentométrique sur base des ions spécifiques $m/z = 329$ (cholestérol), $m/z = 363$, 337 (ergostérol), 380 (Brassicastérol).

Le dosage est possible après silylation des molécules d'intérêt.

3.1.2 Silylation des stérols

- Sous la hotte, ajouter 100µl de pyridine ACS (anhydre) et 100µl de BSTFA (bis-silyltrifluoroacétamide) à l'aide d'une seringue en verre. (Entre chaque prélèvement de réactifs différents, la seringue est rincée avec de l'éther diéthylique)
- Agiter (+- 15 secondes) puis laisser réagir à l'étuve (90°C pendant +- 20 minutes)
- Evaporer à sec le contenu des flacons sous flux d'azote puis reprendre les résidu par +- 200µl de n-hexane et bien agiter au vibreur () Transférer le liquide dans un vial muni d'un insert et sceller.
- Conserver les échantillons au congélateur (-18°C Conservation maximale : 15 jours. Néanmoins, il est recommandé de procéder aux analyses chromatographiques le plus rapidement possible

3.1.3 Conditions d'analyses GC-FID et GCMS

3.1.3.a Conditions d'analyse GC-FID

Chromatographe équipé d'un injecteur automatique split/splitless et d'un détecteur à ionisation de flamme (290°C)

Colonne capillaire HP-5MS ; 30m x 0.25mm ; $df = 25\mu m$

Programme de température : 1 min à 50°C - 20°C/min à 150°C - 10°C/min à 280°C puis 10 min à 280°C

Gaz vecteur : Hélium à un débit de 1 ml/min

3.1.3.b Conditions d'analyse GC-MS

Les paramètres de chromatographie gazeuse sont identiques à ceux du pt. 3.1.3.a. Les spectres de masse sont enregistrés en mode EI à 70 eV; Interface : 290°C ; Mode de calibrage : Stune ; EM voltage 2000 Volts ; gamme de masse : 35 à 500 amu (En spectres complets); source à 230°C.

Mode SIM (selected ion monitoring): ions 329 (cholestérol) et 363, 337 (ergostérol), 380 (Brassicastérol)

3.1.3.c Calcul de la teneur en ergostérol

$$\text{Ergosterol } (\mu\text{g ou ng}) = \frac{\text{Aire Ergosterol} \times \text{Masse ISTD}}{\text{Aire ISTD}}$$

ISTD : Standard interne (Cholestérol cfr 3.1)

4. GUIDELINES FUSAGx - Chimie Générale et Organique

Centiles	Ergostérol Dépôts	Ergosterol Eaux
	µg/g	ng/l
50	0,9	-
75	3	30<E>90
90	5,5	150<E>490

N = 148 (Dépôts) ; N = 162 (Eaux) sur 3 périodes de chauffe (2000-2003)

Une échelle provisoire «de propreté» est constituée sur base des centiles 50, 75 et 90 calculés pour les dépôts. Cette échelle, peut constituer un outil d'aide à la décision très intéressant pour les responsables de la maintenance quant aux attitudes à prendre pour les mesures préventives ou curatives.

Entre 0 et 75 : état jugé satisfaisant sur le plan fongique

Entre 75 et 90 : installation à surveiller. Reprise d'un échantillon 15 j. après une opération de maintenance

Supérieur à 90 : identifier et solutionner le problème 15j après une opération de maintenance complète.

Analyses microbiologiques et biochimiques à ré- envisager pour vérifier l'efficacité des traitements correctifs.

La détection de BRASSICASTEROL dans les profils analytiques indique la présence d' *Exophiala jeanselmii*.

5. LIMITES D'INTERPRETATION

Il faut rappeler que les résultats obtenus ont encore un caractère non définitif et que l'intégration de données complémentaires conduira à définir de manière encore plus fiables les niveaux de contamination en vue d'appliquer des mesures correctives appropriées. Il est tout aussi important de préciser que les niveaux de qualité choisis ne sont pas corrélés avec un niveau de risque pour la santé. Toutefois le principe de précaution doit être appliqué en cas de contaminations élevées.



D/2004/1191/10

Publié par la Politique scientifique fédérale
Uitgegeven door het Federaal Wetenschapsbeleid

Pour de plus amples informations:
Voor meer informatie:

Madame E. Bourgeois
Politique Scientifique Fédérale – Federaal Wetenschapsbeleid
rue de la science 8 Wetenschapstraat
Bruxelles 1000 Brussel
Tel.: + 32-2-238.34.94
Fax.: + 32-2-230.59.12
E-mail: boug@belspo.be
Internet: <http://www.belspo.be>

LEGAL NOTICE

La Politique Scientifique fédérale ainsi que toute personne agissant en son nom ne peuvent être tenues pour responsables de l'éventuelle utilisation qui serait faite des informations qui suivent.

Cette publication ne peut ni être reproduite, même partiellement, ni stockée dans un système de récupération ni transmise sous aucune forme ou par aucun moyens électronique, mécanique, photocopies, enregistrements ou autres sans y avoir indiqué la référence.

Noch het Federaal Wetenschapsbeleid, noch eenieder die handelt in de naam van het Federaal Wetenschapsbeleid is verantwoordelijk voor het gebruik dat van de volgende informatie zou worden gemaakt.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een gegevensbestand of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën of enige andere manier zonder de aanduiding van de referentie.