
**VALIDATION OF MICROBIOLOGICAL AND CHEMICAL INSPECTIONS FOR THE
WORKPLACES**

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 OF CONTENTS

I. INTRODUCTION	2
I.1. Context and general topics of the research	2
I.2. Objectives of the research – Main Axes	2
II. THEORETICAL FRAMEWORK	3
II.1. Fungi And Yeasts	3
II.2. Bacteria	3
III. METHODS	4
III.1. Studied survey population	4
III.2. Measurements	5
III.3. Procedures of analyses	8
IV. RESULTS.....	12
IV.1. Experimental developments	12
IV.2. Measurements on sites	23
V. DISCUSSION	46
VI. APPENDICES	47

Promoter: 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

Details of the network members:

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. CONTEXT AND GENERAL TOPICS OF THE RESEARCH

The problems of bio-contamination in the indoor environments (dwellings and workplaces) led to an awakening of their impact on health and the difficulty of determining the various parameters.

Different complaints and pathologies appeared with the generalisation of air-conditioning. In 1990, the laboratory of mycology of ISP was seen entrusted a programme of evaluation in this field. The level of bio-contamination should be characterised in the buildings equipped with air conditioning in Belgium. A second phase of this study was continued to improve the methods of analyses and to propose remediation strategies (experimentation of disinfection processes, procedures of microbiological book of maintenance, etc). With the exit of these 2 successive research projects, it appeared a priority to develop an information system for occupational physicians, persons in charge of security and hygiene, and services of maintenance. In order to meet this need, training seminars and a website were set up. Information was systematically supplemented and updated. In fact, the aim of these activities was to obtain a better understanding of the problematic and also to develop a platform giving access to information in relation with buildings equipped with installations of air treatment. In its most recent development, this long-term research on workplaces has developed, in a concerted way, complementary diagnostic methods, traditional microbiological procedures and chemical analyses allowing quantification and identification of specific biochemical indicators. Accordingly, a partnership between ISP and FUSAGx was concretised by a new research programme. The results obtained constitute a significant projection in the objective analysis of the potential causes of risks and open new perspectives as well in the field of air-conditioning as in other types of workplaces. The set of themes approached and the strategic axes within the programme are in line with the concerns of other European groups. The number of scientific information and popularization available via the media (scientific literature, articles of synthesis, websites, etc.) are as many evidence. At present, the interest of the medical authorities and the public concerned by bio-contamination increase, and the news show the importance of this field of investigation (Legionellose, Sick Building Syndrome).

I.2. OBJECTIVES OF THE RESEARCH – MAIN AXES

The objective of this research programme consists in developing objective and powerful analytical tools allowing the evaluation of the occurrence of biological agents (fungal and bacterial) and chemical bio-markers (ergosterol, mycotoxins, MVOCs, endotoxins, etc.) produced by moulds and bacteria, and likely to be noxious.

This research is articulated around 2 complementary axes :

- a. Identification of risks factors related on the presence and the propagation of micro-organisms in workplaces. These risks can be related to micro-organisms themselves or to chemical compounds which they produce. It is a question here of supplementing the preventive and interventionist diagnostic approaches especially in mycology. More specifically, the developments related to the microbiological aspects concern the modes of sampling, the implementation of specific media, the refinement of centile values established in previous researches as well as the diversification of the investigated sites. As part of the work devoted to the two associated research teams, ISP ensured the extension of the Web site "Indoorpol.be" so as to cover a broader field related to bio-contamination (agricultural and industrial sectors, hospitals, schools, creches, swimming pools and leisure centres, etc.).

- b. In parallel, the quantification of the fungal bio-markers (ergosterol, MVOC, etc.) was considered by FUSAGx with the development and the validation of chromatographic and spectrometric procedures. Some objective thresholds were defined (centile values) allowing to encourage preventive and corrective measures. In parallel with ISP, the approach of other workplaces has also been taken into account.

The project relies upon a whole concerted process between the two partners and highlights the necessary interdisciplinary. According to the work advancement, a college of experts was requested every 6 months which could check the state of progress and suggested specific orientations which were taken into account. Synoptic of research and detailed reports were respectively provided every six months and each year.

II THEORETICAL FRAMEWORK

The quality of the air on the workplace constitutes a source of risk for health which was underestimated for a long time. The improvement of our knowledge about occupational diseases linked to occupational environment made it possible to attach more importance to the study of the specific agents of these environments and their effects on health.

The "biological risk" is potentially linked to a wide range of micro-organisms. Concerning the contamination of indoor environments, problems are extremely complex because "very diffuse". Indeed, it is not easy to link microbiological contamination with pathologies as various as infection (*Legionella*), allergy, or intoxication. Concerning these last two cases, the means of investigations must integrate the evaluation of the total alive and dead fungal biomass. The same applies to bacteria and other micro-organisms.

II.1 FUNGI AND YEASTS

Fungi and yeasts are pluricellular eucaryotes, saprophytes, symbiotic or parasitic micro-organisms which are propagated by producing spores. The critical factor of development of fungi is the availability of free-water in the substrate.

Within indoor pollution problematic, pathologies related to moulds can be cutaneous, digestive, and especially of respiratory nature.

The toxic, irritating and allergic effects are related to the occurrence and the chemical nature of various cellular components such as certain elements of the cellular wall of the fungal spores, the volatile organic compounds, the mycotoxins or the allergens of proteic origin. The impact related to each of these agents and the knowledge of the different physiopathological mechanisms are often not well known.

The moulds synthesize a very specific sterol (ergosterol) which is a structural element of the membranes. Due to this specificity, the use of ergosterol as a bio-marker is justified. In addition, the volatile metabolites as specific as the géosmine or the 2-éthyl-hexanol, are indicators of the active presence of moulds.

II.2 BACTERIA

Bacteria are procaryotic organisms whose importance in indoor pollution is mainly at the level of the toxins that they release. Within the framework of this programme, only the Gram- bacteria were investigated. The total count of bacteria is also an objective criterion of contamination. More specifically, the Gram- bacteria are a source of endotoxins (constituent of their external wall). The endotoxins are potentially pyrogenic lipopolysaccharides. Their concentration can be

measured and linked to a potential factor of risk for human health. The quantification of these molecules is also significant on specific workplaces.

Certain filamentous bacteria called actinomycetes and more specifically the thermophilic species such as *Thermoactinomyces vulgaris* are implied in cases of allergic extrinsic alveolitis.

III METHODS

The methods implemented in the present research aim at objectively parameterising the microbiological state of the investigated environments. Useful threshold values to define the potential level of bio-contamination of the workplaces are another important objective. To the traditional — but essential investigation — using the counting and the current microbiological identifications, biochemical methods were added to better perceive the importance of the fraction of dead micro-organisms and their potentially noxious effects, mainly in term of allergenicity and toxicity.

Information was also carried out to satisfy the principal field actors (physicians, persons in charge of security and hygiene, etc.) as well as the public. The Web site initially built thanks to a BFSPPO (Belgian Federal Science Policy Office) programme (ST 50/13) and only concerning the buildings offices has, within the framework of this programme, extended to indoor environments.

In parallel, a bibliographical actualisation was maintained.

III.1. STUDIED SURVEY POPULATION

For an optimal effectiveness of the approaches linked to the health-safety of workers, the Belgian legislation proposes a series of diversified measures favouring as much as possible the working conditions. In this context, the bio-contamination and its related factors constitute a vast field of investigation in which the scientific approach comes in support from a vaster strategic reflection which integrates, at the same time, the prevention of the risks and the installation of corrective measures. It is important to minimize the risks related to the proliferation of the micro-organisms which metabolites or cellular remains expose the workers to various nuisances and whose occurrence, often perceived in a diffuse way is difficult to perceive. The approach of this research aims to set up procedures, analyses, and controls of workplaces by using specific microbiological techniques and analytical methods searching specific bio-markers.

Among the interesting bio-markers, this research programme proposes the development of a methodology allowing the quantification of **the ergosterol**, a specific molecule only produced by the fungus. This molecule has been found in many humidifiers and the results were confronted with those of the fungal analyses on Agar media. Provisional threshold values could be drew. The same applies to **the endotoxins** which are searched for as toxins but also as biological indicators of the Gram bacteria -. Threshold values were also drew for the humidifiers water.

In the "industrial" part of the research, a specific approach of metal working fluids was considered. Indeed, these media rich in organic substances are pulverized as aerosols and generally recycled many times. They constitute a favourable medium for the amplification of numerous micro-organisms. The microbiological analyses confirmed the existence of a bacterial and/or fungal load sometimes excessively high. In a novel approach, these fluids were studied as well for their content of ergosterol (of fungal origin) as of endotoxins, specific bacterial bio-markers (Gram-).

In addition, sampling systems and secondary metabolites analysis produced by moulds (**MVOCs**) were also realised.

All these experiments were carried out in the following workplaces:

- Buildings offices, with or without air conditioning
- Buildings containing archives, books
- Industrial buildings (metal working fluids)
- Laboratory handling contaminated materials
- Agroalimentary buildings (flour milling)

III.2. MEASUREMENTS

The sampling methods and traditional microbiological analyses developed in the previous work and used in a routine way at ISP were adapted according to circumstances' and systematically improved. They are presented as checking form at appendix. Synoptic of the means of investigation used can be visualised on the new version of the Web site "www.indoorpol.be".

III.2.1. Air sampling for micro biological analyses (revival micro-organisms)

Procedure ISP/MYC/AC01 & 03

- *Material*: the impactor used is the RCS+ of Biotest, using flexible strips filled with a specific Agar medium. The basic volume taken inside the buildings is 80 litres air. Outside, in summer, this volume can be decreased by half.

- *Sampling*: In the offices, the air is generally sampled at 20 cm of air vent (pulsated air) considering the slope of the deflectors, and at the level of the work tables, eg. on the level of breathing in sitting position (ambient air).

During the investigation, a sample of outside air is always realised on the level of the air intake in order to be used as control.

- *Applicability*: offices without air conditioning, any environment of work (with adaptation of sampling volumes), dwellings, etc.

III.2.2. Air sampling for ergosterol analyses

Procedure FUSAGx/ISP/AC08

- *Material*: Sampling on polycarbonate filter (aspiration using a pump SKC, 5l/min), with Impiger containing a peptoned solution or with a MAS-100 whose Agar medium was also replaced by a peptoned solution.

- *Sampling*: samplings on filters as those carried out with the Impiger method use a flow of pump of 3 l/min during 4 hours, giving approximately 720 litres of sampled air. With the MAS-100 (flow of 100l/min), the samples realised during 5 minutes, giving 500 litres of sampled air.

In the last two cases, the solution is then recovered in sterile Flask containing 1 ml of phenolic solution (glycerol (10): water (90)) to 0.2 %.

- *Applicability*: any workplace (with adaptation of the sampling volumes), dwellings, etc.

III.2.3. Air sampling for MVOC analyses

Procedure AIR/MVOC/1

- *Material:* sampling by solid-phase micro-extraction (SPME), or by trapping of MVOCs on specific adsorbents and elution by solvents.
- *Sampling:* fibre exposure SPME (standard PDMS and Carboxène) during 4 hours
- *Applicability:* any workplace (with adaptation of the sampling volumes), dwellings, etc.

III.2.4. Sampling of dust deposited on smooth support, for microbiological analyses (revival micro-organisms)

Procedure ISP/MYC/AC04

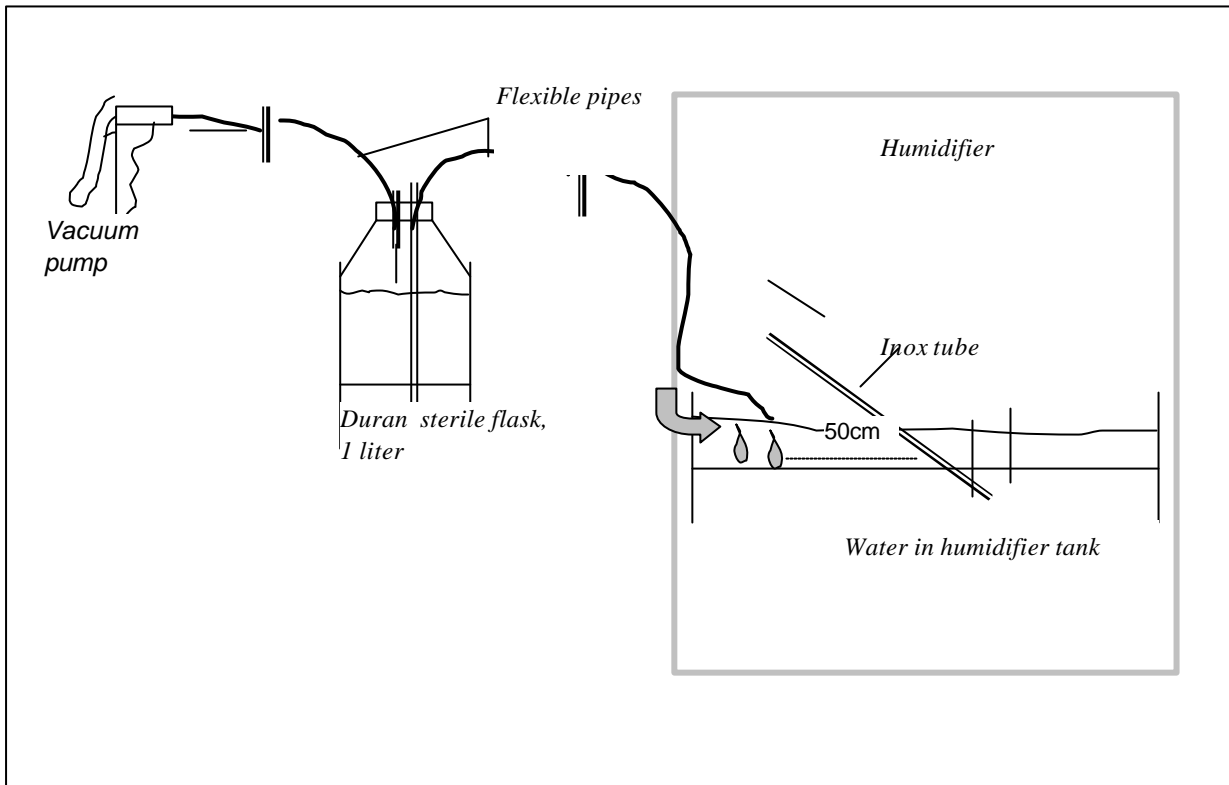
- *Material:* the fine dust of air deposited is collected on a plate of glass (20cm X 20cm), washed beforehand with an alcohol solution and deposited on furniture in a building.
- *Sampling:* after 7 days, samples of surface are realised starting from a kit of Petri dishes (23.74 cm²) filled with specific Agar media. These dishes are applied using an automatic applicator allowing a pressure of 25 gr/cm² during 10 seconds (ISO SAY 14698-1). They are then brought back to the laboratory to be incubated at suitable temperatures.
- *Applicability:* any workplace (with adaptation of the culture media and t° of incubation), dwellings, etc.

III.2.5. Sampling of liquids for microbiological analyses (revival micro-organisms)

Procedure ISP/MYC/AC05

- *Material:* the liquid is taken with a system of 2 sterile pipes connected to a sterile glass container of one litre, put in depression with a pump.
- *Sampling of water in the humidifiers:* the system of 2 metal pipes is placed in such manner so that the metal guide touches the bottom of the tank. In this way, the end of the first pipe is located at 1 cm from the bottom of the tank (sample of water with possible deposits) and the second tube at 5 cm from the bottom (see appendix A); the sampling is realised by carrying out a translation of the metal tube in the tank, while taking care not to take near the fresh water admission.

Figure 1: Simple system for sampling water in humidifier tank



- *Applicability*: water in the humidifiers, water of cooling towers. Procedure is also applicable to the metal working fluids (white water), various industrial water, etc.

This sampling allows quantification and identification of moulds and bacteria as well as physicochemical measurements such as pH, conductivity and the ATP.

III.2.6. Sampling of liquids for ergosterol quantification

Procedure FUSAGx / ISP / AC08

- *Material:* the liquid is taken with a system of 2 sterile pipes connected to a sterile glass container of one litre, put in depression with a pump.
- *Sampling of water in the humidifiers:* the system of 2 metal pipes is used with the metal guide touching the bottom of the tank. In this way, the end of the first pipe is located at 1 cm from the bottom of the tank (sampling of water with possible deposits) and the second tube at 5 cm from the bottom (see appendix A); the sampling is realised by carrying out a translation of the metal tube in the tank, while taking care not to sample near the fresh water admission.
- *Applicability:* water in the humidifiers, water of the cooling tours. Procedure is also applicable to the metal working fluids (white water), various industrial water, etc.

III.2.7. Sampling of liquids for quantification of endotoxins

Procedure ISP / MYC / AC09

- *Material:* apyrogenic pipette of 50ml fixed on a small pump. Apyrogenic flasks of 50 ml are used. Pipette and flask are of single use.
- *Sampling:* a sample of 50 ml is taken while taking care to directly introduce the sample into an adapted flask. The sample is preserved during maximum 15 days at -20°C.
- *Applicability:* water in the humidifiers, water of the cooling tours. Procedure is also applicable to the metal working fluids (white water), various industrial water, etc.

III.2.8. Sampling of carpet dust and similar supports, for microbiological and biochemical analyses

Procedure ISP/MYC/AC06

- *Material:* a vacuum cleaner of 1200W equipped with filter-holder nozzle. The filter is "3M filtrete", (MC/US/diam 57 mm/PB) and is weighed beforehand.
- *Sampling:* dust is aspired during 2 minutes on a surface of 1m².
- *Applicability:* dust of carpets, mattresses, armchairs, etc.

III.3. PROCEDURES OF ANALYSES

Analyses procedures described below highlight the complementarity of the microbiological and biochemical approaches. As a matter of fact, the firsts take into account the alive or revival microflora, the seconds contribute to measure the whole of the fungal components (alive cells, cellular remains and spores alive or not) and bacterial. A last aspect relates to the measurement of chemical parameters which contribute to a precise diagnostic.

III.3.1. MICROBIOLOGICAL ANALYSES (REVIVAL MICROFLORE)

Air and surfaces

Procedures ISP/MYC/AC02 & 03

Searched micro-organisms:

- **The mesophilic and hygrophilic moulds** (isolated at 25°C and developing on materials strongly available in water with a high a_w). The most frequent isolated phytopathogenous have a strictly outside origin (*Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea*, etc.). Others are able to develop inside places with an abnormally high humidity (*Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus versicolor*, *Stachybotrys chartarum*, etc), even in water (*Exophiala*).
- **The mesophilic and xerophilic moulds** (isolated at 25°C and developing on materials not very available in water with a weak a_w). Among the xerophilic species, *Penicillium* or *Aspergillus* (*A. glaucus* gr..) are most frequently isolated inside the buildings.
- **Thermophilic moulds** (isolated at 45°C). These moulds mainly grow during the decomposition process of the organic matter with release of heat. Their origin in the offices buildings is generally from outside. They are very abundant in the processes of composting and in the ground (*Aspergillus fumigatus*).
- **The total counting of the bacteria developing on TSA at 25°C:** In majority these bacteria are likely to develop in the environment. High quantities means a contamination somewhere on the site.
- **The total counting of the bacteria developing on TSA at 37°C:** In majority these bacteria have a human origin. Present in too high quantities in a building, they represent an insufficient ventilation and/or an over-crowded environment.
- **The total counting of the Gram- bacteria:** these bacteria are responsible for the presence of endotoxins in the environment.

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	Milieux gélosés	t° incubation	Durée incubation
Bactéries totales de l'environnement	TC de Biotest 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

Liquids

Procedure ISP/MYC/AC05

The same revival micro-organisms are isolated on the same agar media as used for surfaces (Table 2).

Bacteria

Water is seeded by dilution plating on TSA. Basic dilutions used are: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Two series of Petri dishes are prepared, one incubated at 37°C, the other at 25°C. Additional dilutions can be added according to the situation.

Moulds

Water is seeded by inclusion in MEA chloramphenicol which is poured (< 50°C!!) on the sample. Basic dilutions used are: 5ml, 1 ml, 10^{-1} , 10^{-2} . Two series of Petri dishes are prepared, one incubated at 37°C, the other at 25°C. Additional dilutions can be added according to cases.

Thermoactinomycetes

Respectively, 50 and 250ml of water are filtered (filter 0.45 µm). The cassettes are then filled with TSA + Actidione.

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

Germes	Milieux gélés	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
Thermoactinomycetes	TSA novobiocine	52°C (humide)	2 jours

Specificity of the protocols according to the analysed matrices

Water of humidifier: measurements of pH and conductivity, the examination of the deposits, the dosage of endotoxins and ergosterol are added.

Soluble metal working fluids (white water): the samples are dispersed in Tween 80 at 0,01% before proceeding by dilution plating. Endotoxins and ergosterol are also quantified.

Carpet dust and related supports

Procedure ISP/MYC/AC06

In the laboratory, the filter is reweighed after sampling. The difference gives the weight of collected dust. A sterile aqueous solution of Tween 80 (0,02%) is added to fix the first concentration at 10^{-2} (for example, to 0.492 gr. of dust, one adds 49.2 ml of solution). The solution is then agitated at moderate speed (side agitator) during 20 minutes at ambient temperature. Seeding on adequate agar media is realised by dilution plating (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) and Petri dishes are then incubated.

Micro-organisms systematically searched:

- **The hygrophile mesofilic moulds** (isolated at 25°C and developing on materials strongly available in water with a high a_w). The most frequent isolated species are phytopathogenous species have a strictly outside origin (*Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea*, etc.). Others are able to develop inside places with an abnormally high humidity (*Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus versicolor*, *Stachybotrys chartarum*, etc), even in water (*Exophiala*).
- **The xerofilic mesofilic moulds** (isolated at 25°C and developing on materials not very available in water with a weak a_w). Among the xerofilic species, the *Penicillium* kind or *Aspergillus* (*A. glaucus* gr..) are most frequently isolated inside the buildings.

Micro-organisms searched for in specific environments:

- **Thermofilic moulds (isolated at 45°C)**
- **The total counting of bacteria developing on TSA at 25°C**
- **The total counting of bacteria developing on TSA at 37°C**
- **The total counting of Gram- bacteria**

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. BIOCHEMICAL ANALYSES (SEARCH FOR BIO-MARKERS)

ATP:

ATP is a basic energy molecule used by all alive beings. So, it is a good bio-marker related to the occurrence of biochemical material resulting from living or dead organisms.

Method: Hi-lyte test.

Applicability: water, soluble metal working fluids.

Endotoxins

Endotoxins are lipopolysaccharide (LPS) constitutive of the wall of Gram- bacteria and are responsible for a part of their toxic properties. The interest of quantification is double: because of their own toxicity and as a Gram - bacteria bio-marker.

Method: Direct LAL test or chromogenic. The chromogenic methods of LAL test (kinetic and "end point" methods at 405 Nm, "end point" method with diazotization coupling at 545 Nm) were compared in terms of repeatability and linearity. Gelation and turbidimetric methods were not exploited in this study.

Applicability: water, soluble metal working fluids.

Ergosterol

It represents the majority of the sterol in the membrane of yeasts and moulds, which makes it interesting as a fungal bio-marker. As for the endotoxins, it is a bio-marker of the TOTAL fungal load, revival or not.

Method: gas chromatography and GCMS.

Applicability: water, diluted cutting fluids, various dust and materials.

MVOC

The volatile metabolites of fungal origin allow the detection of moulds which constitute, according to their nature, an indirect potential risk of toxicity. It is for these two reasons that they are searched but not measured.

Method: by GCMS.

Applicability: air.

Mycotoxins

Mycotoxins represent a very large range of secondary metabolites. According to the genus and species, they differ considerably, as well for their chemical structure as for their properties on living organisms.

Method: by Elisa tests and spectrometric confirmation.

Applicability: cereals handled in laboratory.

IV. RESULTS

IV.1. EXPERIMENTAL DEVELOPMENTS

Throughout the convention of research, a detailed attention was brought to the methodological aspects. This continued action led to validated procedures and improvements which will be put in prospect in the conclusions (chapter V).

IV.1.1. MEASURING OF THE CONTENT OF ERGOSTEROL IN THE SPORES OF DIFFERENT MOULDS

In a preliminary approach, the measuring of the ergosterol was developed on the basis of the data resulting from literature and by a comparative evaluation of various chromatographic methods which guided the technical choices. Ergosterol being included in lipidic double-layered and potentially present in form of esters, the release of the molecule requires obligatorily a saponification of the samples followed by a solvent extraction most effective possible. The need for developing a rapid method taking into account the number of analyses to be realised is also required. This is why a first stage consisted of the development of a methodology of extraction assisted by microwaves (EAM).

Several samples of freeze-dried biomasses and spores from fungal species sampled in the workplaces were studied. It appears that the quantities of ergosterol found following the application of microwaves are more significant. That shows a better effectiveness of this process compared to the traditional techniques (heating with backward flow of the samples) which appeared badly adapted to the studied problematic. They do require the use of big quantities of

reagents and solvents and take a long time to practice. Rapid method by EAM led to results of an acceptable repeatability taking into account heterogeneity of the freeze-dried biomasses and the samples of spores in suspension (Table 4 has and B).

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

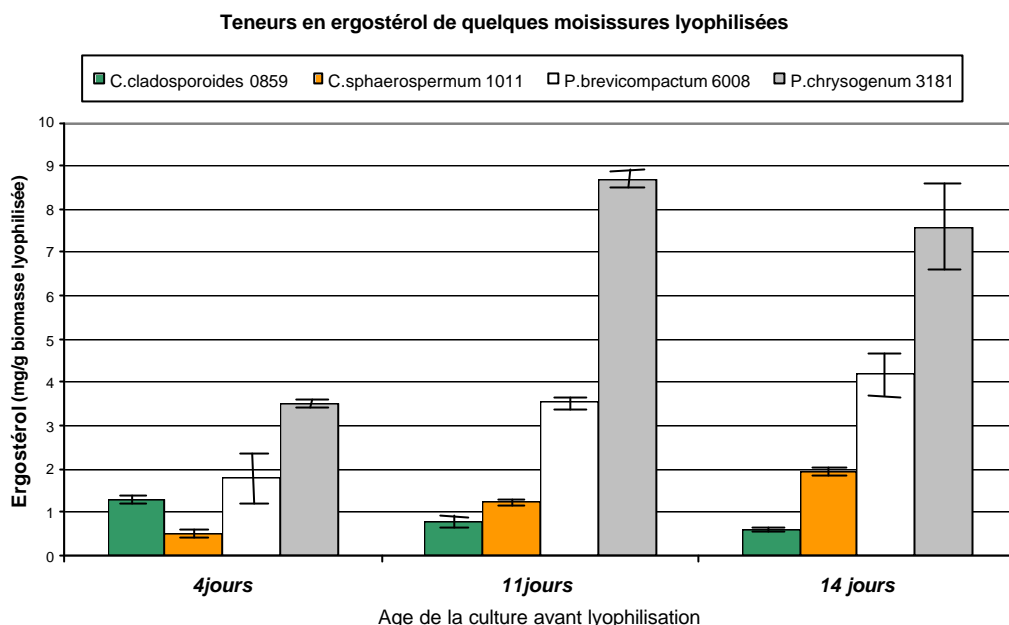
a. Moisissure sous forme lyophilisée (N° IHEM)		Ergostérol (mg/g)*
Milieu humide	<i>F. solanii</i> (2813)	7.8 ± 0.4
Milieu aérien	<i>A. alternata</i> (4706)	3.5 ± 0.2
	<i>C. cladosporoides</i> (0859)	0.6 ± 0.0
	<i>C. herbarum</i> (3260)	0.8 ± 0.1
	<i>C. sphaerospermum</i> (1011)	1.9 ± 0.2
	<i>P. brevicompactum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

The lyophilisat which consists of a mixture of mycelium and spores has contents of ergosterol strongly variables from one strain to another, even within the same genus (*Cladosporium*).



These fluctuations could be explained by a variation, due to the age of culture before freeze-drying, of the proportions between mycelia and spores. But they complicate the possibility of attributing a precise value in ergosterol to a fungal strain or species. In addition, two different culture media were tested in order to highlight a possible influence on the content in ergosterol of the spores. The quantities of ergosterol contained in the equivalent of 1 000 spores are extremely variable from one strain to another (e.g. *A. alternata* and *B. aclada*) even within a genus. Between *Botrytis aclada* and *Botrytis cinerea*, the ratio is 30 to 40, whereas both *Cladosporium* tested are close. Whatever the growth medium is, the values in ergosterol remain roughly the same. However, during sampling and handling of the suspensions of spores, the sources of variation can be numerous: the medium (conditions of growth), the age of the mycelium, the sampling (fragments of mycelium, formation of spores cluster, heterogeneity) and finally, errors inherent in counting.

In order to determine if these various factors strongly influence the final result, we compared 3 different cultures obtained from the same strain.

2 strains were tested (*C. sphaerospermum* and *P. chrysogenum*) on the 2 same agar media (PDA and S10) (Table 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

According to this table, an acceptable dispersion of the values obtained for each culture is observed, which consolidates the reliability of the results presented (except for *C.sphaerospermum*). Numerous samples taken on site and analysed by the mycology section of ISP showed very frequently the occurrence of mycelia fragments at the same time as the revival fungi.

The sterolic composition of three *Cladosporium* (*C.sphaerospermum*, *C.herbarum*, and *C.cladosporioides*), two *Penicillium* (*P.Chrysogenum*, *P.brevicompactum*), *Fusarium solanii* and *Alternaria alternata* was investigated by gas chromatography coupled with mass spectrometry. All the recorded profiles reveal the ergosterol as the major component of the extracts. Even if other sterolic components related to ergosterol were found (dehydroergosterol, fungisterol, episterol, dehydroergosterol, etc), this investigation did not reveal any molecule specific to a species or a particular genus.

Nevertheless, since the first humidified water samplings realised within this study, the mycologic analyses revealed the frequent occurrence of *Exophiala jeanselmei*, commonly called "black yeast" which develops preferentially in this environments. The sterolic analyses revealed a particular molecule whose fragmentations obtained in GCMS (Figure 7) correspond to those of the brassicasterol {(2E)-ergosta- 5, 22 – dien – 3 β - ol}.

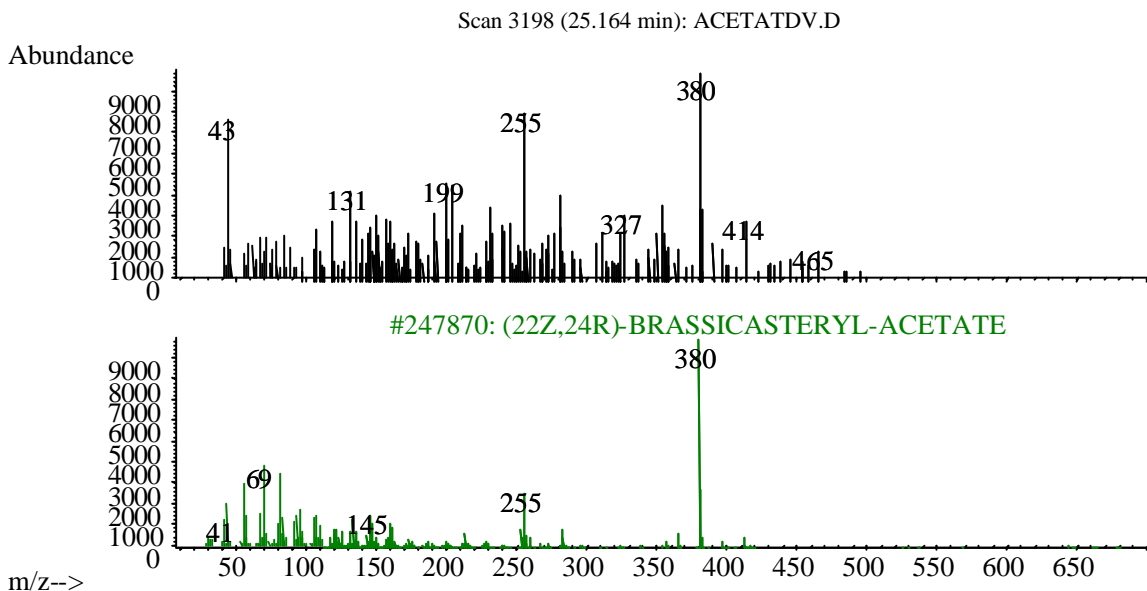


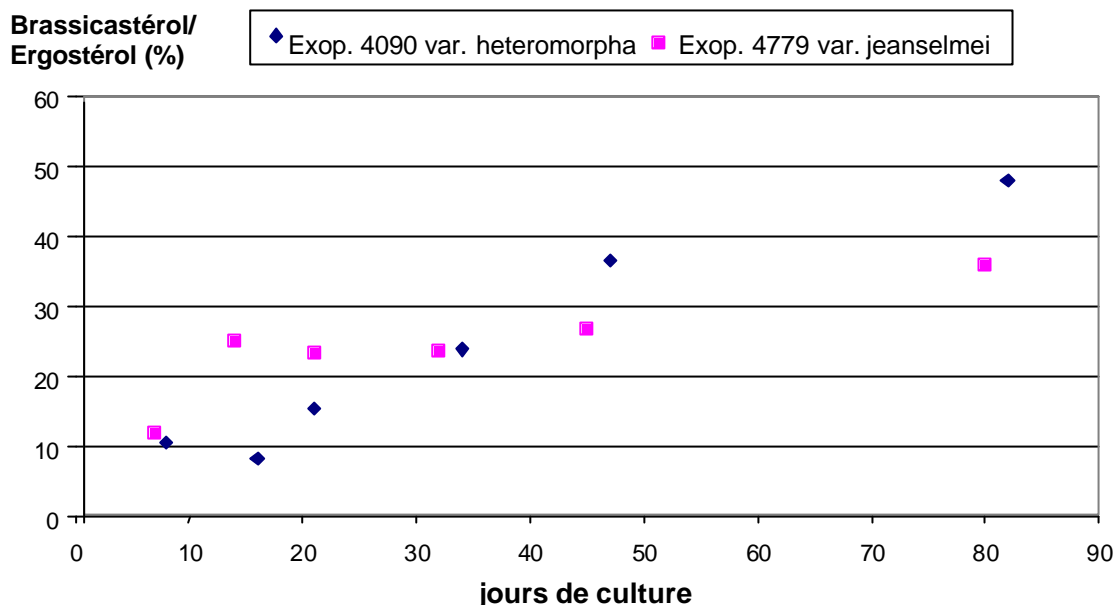
Figure 2: Fragmentations caractéristiques de l'acétate de brassicastéryle analysées par GCMS. Vue supérieure: spectre de masse enregistré au départ d'un *Exophiala jeanselmei*. Vue inférieure: Spectre de masse de référence.

These observations led us to consider brassicasterol as another potential fungal marker. Additional experiments were then realised on various fungal species previously isolated in humidifiers tanks: *Acremonium strictum*, *Phialophora fastigiata*, *Phialophora malorum*, *Exophiala jeanselmei* var *heteromorpha*, *Exophiala jeanselmei* var *jeanselmei* and kept within BCCM/IHEM Culture Collection. They were then put in culture on liquid media (S10 type). The biomass was then analysed by GCMS after EAM and derivatisation of sterols.

On the 6 strains tested, brassicasterol has presented only in 2 strains of *Exophiala jeanselmei*, what should confirm the "role of indicator" of this molecule.

The influence of the age of the fungi on the ratio "brassicasterol-ergosterol" was the subject of a related study (Figure 3).

Figure 3: Evolution de la proportion en stérols au cours de cultures *d'Exophiala* provenant d'humidificateur et cultivé sur S10



Day after day, the proportions in brassicasterol and ergosterol increase in a *quasi* linear way, especially from "day 14" of culture (coefficient of correlation of 0.987 and 0.971 for respectively *Exophiala* 4090 and 4779). That could mean that a high value of this ratio is characteristic of old fungal cells, even presenting a more significant mortality.

The methodology developed for the measuring of the ergosterol in biomasses samples, spores and other samplings realised by ISP, consists in:

- an extraction (MeOH) - saponification(NaOH) utilising them microwaves - EAM (Extraction assisted by micro-waves)
- an extraction liquid-liquid with cholesterol as internal standard
- an evaporation of the solvent (n-hexane) followed by a recovery in methanol
- an analysis by Hplc-UV with quantification by external calibration

—— If the result is **positive** (strongly contaminated sample), a confirmation is possible by derivatisation (TMS) and analyses Gc-ms.

—— If the result is **negative** (sample not much or not contaminated), derivatisation of ergosterol in "silylée form" (TMS), and quantification per Gc-ms with internal calibration (cholesterol)

This analytical protocol was used in the measurements realised for all the surveys conducted in partnership by ISP and FUSAGx (see appendix B).

In conclusion: the preliminary analyses of fungal biomasses (spores, species, ages and different sizes), revealed a relatively significant dispersion of the contents of ergosterol (searched bio-marker). An heterogeneity also occurs according to the medium on which the biomass was taken and/or cultivated. It quickly appeared that it was preferable to establish guide-values for

microbiological and biochemical level because no clear correlations could be highlighted. The guide-values will be defined in a complementary way.

The final diagnosis by a "multi-method" approach which confronts diversified observations will be reinforced.

IV.1.2. MICROBIAL VOLATILES ORGANIC COMPOUNDS (MVOCS)

MVOCs found in a room can be used as indicators of a fungal contamination. The detection of secondary volatile metabolites in ambient air represents a real challenge for the analyst:

- Except in the event of very intense bio-contamination, the contents of volatile molecules are always very low and they often belong to varied chemical classes. Nevertheless, certain molecular types were associated to specific strains (e.g.: the 2-ethyl-hexanol in *Aspergillus versicolor*).
- Fungal volatile metabolites are sampled at the same time as the other chemicals produced in particular by materials such as: colours and varnishes, various coatings and of course human activities.
- In addition, probable biosynthesis by moulds of various metabolites depends on the edaphic and environmental conditions.
- Heterogeneity spatiotemporal of the investigated places of sampling is also a source of variability. Indeed, the analysis of air sampled on ground level can reveal very significant differences compared to the samplings taken at human breast height.
- Results are potentially influenced by the sampling methodology used. A dynamic sampling by trapping volatiles on cartridges of adsorbents leads to divergent but complementary results from those which can be recorded following simple sorptions (passive sampling).
- Occurrence of specific substances from various genus and/or species allows sharpening the diagnosis of the contamination because they can indicate the presence of moulds even if they are not visible (development of a hidden biomass).

Before field investigations, it was agreed to study the production of MVOCs by various moulds. The teams of FUSAGx and ISP proceeded to many series of tests in order to study the volatiles released according to culture media's; to develop a culture technique in laboratory which, as well as possible, reflects the conditions met in indoor pollution. They also investigate the kinetics of production, i.e. evolution of the MVOCs releasing by specific fungal strain in the course of time. Indeed, the age of a mould has importance on its metabolism and from there and thus on its biosynthetic possibilities.

To adjust the technique, a preparatory test was realised on *Aspergillus versicolor* (N° IHEM 6898 and 2157), mould frequently met in indoor environment. Sampling was realised by SPME (Solid Microextraction phase: sorption of MVOCs of the space of head on a retractile fibre assembled on a aiguille of chromatographic syringe). This technique was selected for its simplicity.

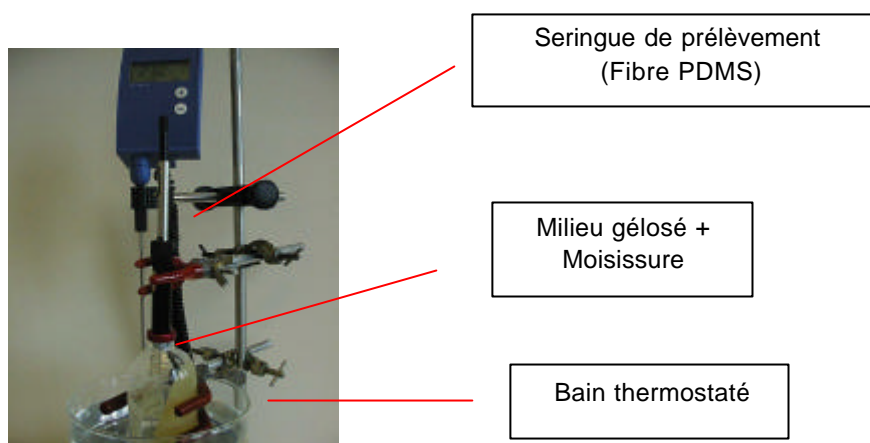


Tableau 6: Profils en MVOCs de deux souches d'*Aspergillus versicolor* cultivées dans des conditions rigoureusement semblables: soit en flacon obturé par une bourre de cellulose classique FH (croissance rapide des mycélia) permettant l'entrée d'air soit en présence d'un septum et d'un filtre 0.2 µm (croissance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

Profiles recorded differ according to the strain and culture method. The 2 studied strains present extremely different profiles in volatiles: strain 2157 producing a large range of terpenic compounds; the second releasing mainly farnesene. After this observation, ones decided to test a sufficient number of strains of the same species before making the assessment in volatile products by this species.

Thus, many strains of various genus and species were analysed according to experimental protocols' rigorously followed during studies undertaken in parallel with the project (see framed I and II below).

FRAME I

® Study of MVOCs released by various mycelial strains frequently identified in the indoor environments. Kinetic follow-up of the productions of MVOCs on agar media.

- *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Acremonium pteridii*, *Acremonium strictum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Penicillium restrictum*, *Phialophora fastigiata*, *Phialophora malorum* produce all of nonspecific sesquiterpenic hydrocarbons in variable quantities according to species'. Molecules oxygenated in C8 (1-octene-3-ol, 3-octanone) were highlighted on certain strains but not enough specific to be used as biological indicators.
- *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor* and *Penicillium aurantiogriseum* recognised in the literature as being implied in many problems of contamination of buildings are, among the studied strains, those which produce the most significant quantities of MVOCs.
- The kinetics of emission of MVOCs has an evolution similar to microbial growth in 3 phases: a phase of increasing production, a stationary phase then a decline phase. The maximum rate of production of MVOCs depends on the type of strain and ranges between 2 and 34 days!

According the study's conditions, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium crustosum* and *Phoma limeti* do not release any MVOC.

FRAME II

® Study of MVOCs released by 37 strains of *the Trichoderma* genus

- 3 types of strains according to whether they produce 1 very specific majority metabolite/of many metabolites (mainly of very diversified hydrocarbons sesquiterpenic)/of very small quantities of MVOCs
- Analyze in principal component of the profiles: establishment of a powerful chimiotaxonomic filiation which comes in support from the traditional mycological identifications
- 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).

® Study of MVOCs released by 86 strains of dermatophytes

- very large heterogeneity of the MVOCs profiles
- description of oxygenated molecules, sulphur products and hydrocarbons sesquiterpenic for only some strains.
- Reduced possibility of discrimination between strains.
- 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)

It comes out from these various tests that it is difficult to attribute a molecular type to a given species and this, even in conditions of controlled and reproducible cultures on Agar medium. Nevertheless, as part of this programme, culture on building material were realised under controlled conditions which "reproduce" as well as possible a contaminated environment (T°, air relative humidity) (wallpaper, plaster, insulator, materials of ventilation ducts, etc.) before sampling on sites (Figure 4).

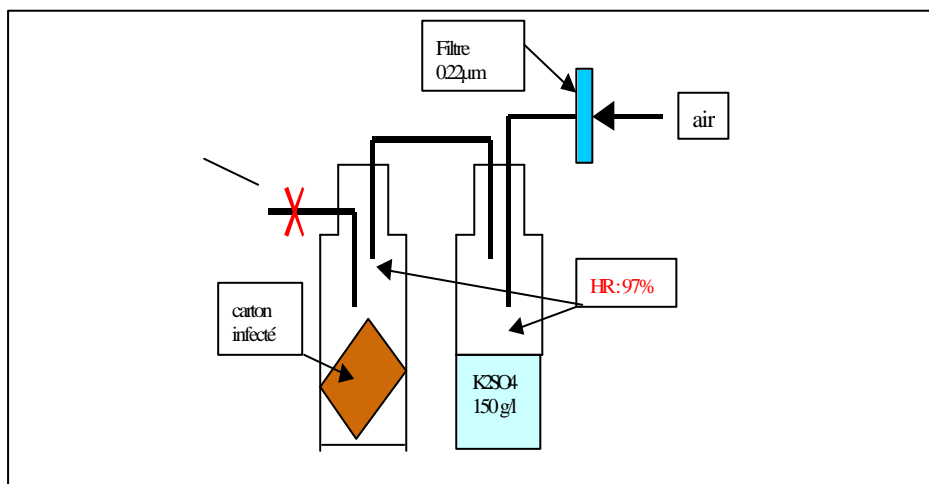


Figure 4: Dispositif de laboratoire pour la culture contrôlée d'*Aspergillus versicolor* N°1129 sur plaque de plâtre et pour le prélèvement des MVOCs

Two types of sampling of MVOCs were realised after 3 months of culture:
 → sampling by SPME (Fibre carboxene-PDMS- lasted 30 and 120 min T)
 → sampling by aspiration of air in the enclosure, and passage on cartridge "ASSET" which has the property to adsorb the volatile molecules. After pumping, they are then desorbed using a minimum volume of solvent, then injected in 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

The results presented in Table 7 clearly highlight that the profile in volatiles varies according to the technique of sampling. Principles "guiding" the retention of MVOCs are primarily different: in the case of the trapping on column ASSET, it is about an adsorption while for the SPME, it consists in a mixed interaction: sorption-adsorption. However, and although the strain tested is different from the 2 strains tested on Agar medium, certain molecules are found: 1,3-dimethoxybenzene (common for the 3 strains), 2-ethyl-1-hexanol and methyl ester of the acid -ethyl-hexanoic (present in 2 strains). The same device was used to study *Aspergillus Niger*. In this case 2-éthyl-1-hexanol was detected as majority component accompanied by 1-octene-3-ol. (Trapping on column ASSET).

In conclusion: the experimental developments concerning the MVOCs analyses reported above highlight the difficulties related to the investigation of this type of bio-markers (difficult to sample and variables according to the substrates or the culture media and strains). In real conditions, two other factors are added to those which were raised: simultaneous occurrence of several fungal species at very heterogeneous stages of development and the presence of very varied molecular "cocktails" of volatiles substances which are not from fungal origin. Nevertheless, the detection of 2-ethyl-1-hexanol confirms the presence of *Aspergillus fumigatus*, frequently met in the polluted environments.

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

Preliminary tests (realised on water and air) on the basis of chromogenic method (LAL kit of measuring) were not very significant. The implementation of quantifications, extremely delicate, requires an experienced laboratory assistant and draconian analytical precautions. Indeed, it is not rare to have higher results in the blancs compared to the samples, probably due to the occurrence of interferences. In addition, the test has a lack of specificity regarding the objectives. Consequently, by mutual agreement between the partners of research and the expert's members of the follow-up committee, this analytical approach was abandoned.

IV.2. MEASUREMENTS ON SITES

IV.2.1. OFFICES BUILDINGS

IV.2.1.1. Humidifiers

Humidifiers used in systems of air conditioning constitute privileged environments for the amplification of specific biomass. Propagation of micro-organisms and their remains in workplaces can constitute a factor of nuisance. Due to the specificity of this aquatic microflora, acquired immunity is not specifically adapted to this potential type of aggression.

Reminder

Several reference data had been obtained during preceding programmes. They are summarised in the frame below.

- **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**

Microbiological study of 451 humidifiers

The importance of the aquatic microflora was systematically highlighted. Nevertheless, some genus which do not belong to this specific microflora have been detected. They have to be considered as coming from different sources of contaminations.

The guide-values presented below integrate the whole of the analyses realised at ISP, not only as part of this programme, but also as part of investigations belonging to the activities of the Mycology Section.

pH and conductivity

Concerning measurements of conductivity, more than 75 % of the examined samples were below the 1 500 µS/cm advised. But we also recorded particularly high maximums (10 500 µS/cm). Some pH were also particularly high (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	

Bacteria

Compared to the median values obtained during first BFSPO programme, a reduction in the bacterial contamination is observed. Centile 50, for the incubated bacteria at 25°C, passes from 50 000 to 23 000 CFU/ml, and for the bacteria incubated at 37°C, the reduction passes from 10.000 to 600 CFU/ml (maximum). These reductions by the preventive and corrective actions carried out these last years.

- monitoring of the microbiological quality of water, regular corrective measurements (biocides, deconcentration, etc.) what influences particularly the concentration in "environmental" bacteria developing at 25°C maximum
- increase of proportion of outside fresh air when there is recycled indoor air, which influences particularly the concentration in bacteria of "human" origin developing at 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		

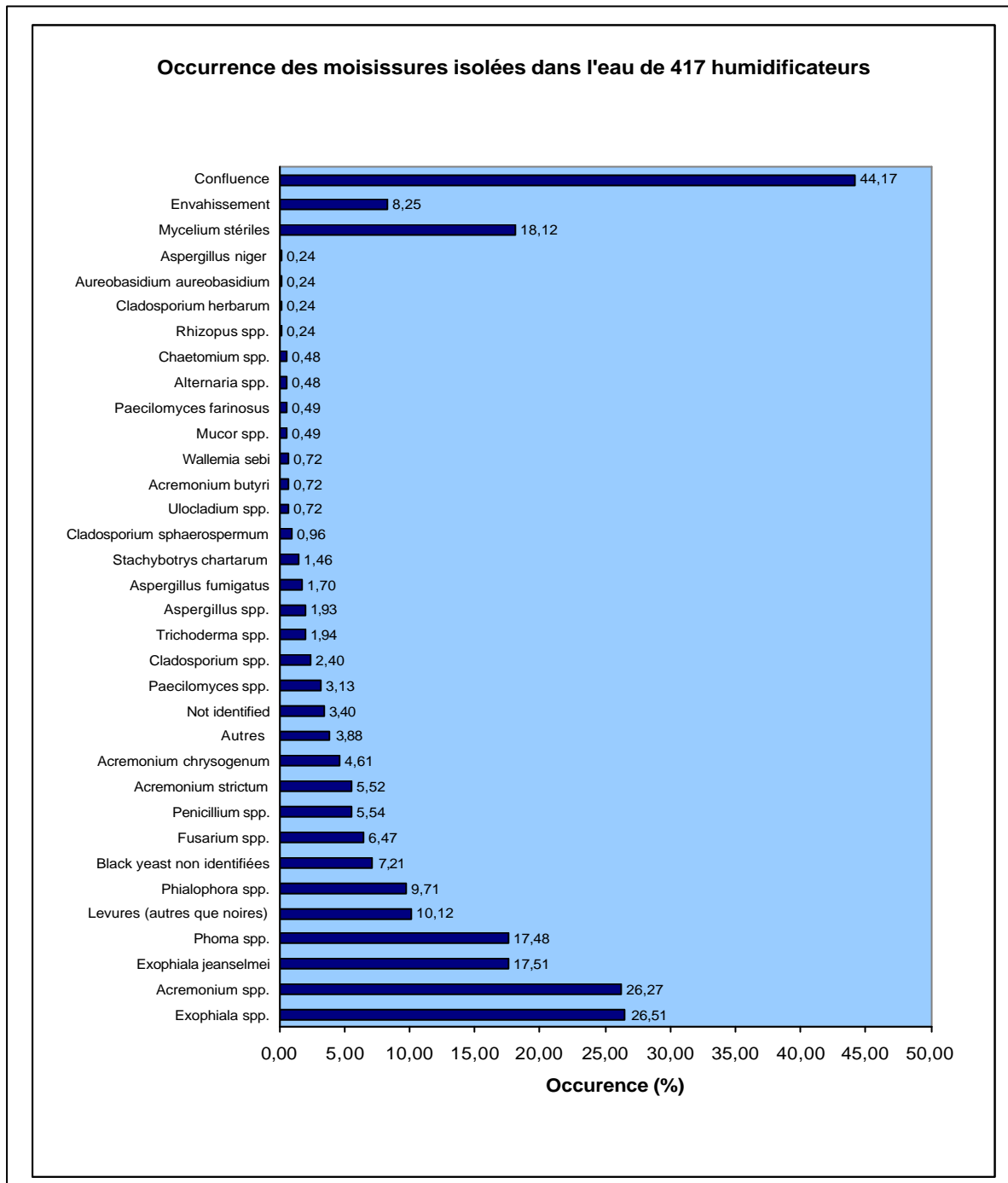
Moulds

For moulds, median value remains the same (10 CFU/ml) that median obtained during previous work. However, we insist on these centiles values which only concern moulds able to develop in liquid media. It is thus essential during a counting to identify the different taxa, at least with the genus, in order to distinguish the species developing in liquid media from the other moulds. These species are capable to amplify in the humidifier. This limiting value of 10 CFU/ml must also be moderate according to the specificity of the isolated moulds.

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		

Table 13 shows the most frequently moulds sampled in humidifiers in Belgium. "Black yeasts", including *Exophiala jeanselmei* and *Phialophora spp.* largely dominate as well as *Acremonium spp.* et *Phoma spp.* and, with a weaker occurrence *Fusarium spp.*.



ATP

At the beginning, the quantification of the ATP was realised to confirm the results concerning the revival micro-organisms, particularly when the results were relatively low or negative. Indeed, the recent use of biocide before samplings, for example, removes any life but the majority of biocides does not eliminate the ATP. Let us remind that the ATP, as a basic energy molecule used by all alive beings may be used as bio-marker related to the occurrence of biochemical material resulting from living or dead organisms.

However, with the accumulation of the results, a scale consisted in centile values was calculated (table 14). Values higher than 700 units of luminescence generally indicate a microbiological contamination.

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		

The ergosterol in water and deposits

In order to be most representative as possible, the investigation related to various humidifiers located in different buildings and maintained by various maintenance firms. These last use their own protocol of maintenance, with using sometimes biocides with different frequencies.

Analyses quoted here above were done on a 3-years consecutives period according to annual heating seasons which begin in general the second week of October and last towards the end of March.

During these heating seasons, 162 groups were investigated (162 water and only 148 deposits (certain groups did not contain any deposit)).

The number of cases where ergosterol was detected (positive cases) is expressed in percent and evolution of the numbers of positive cases according to seasons' is represented on figure 5.

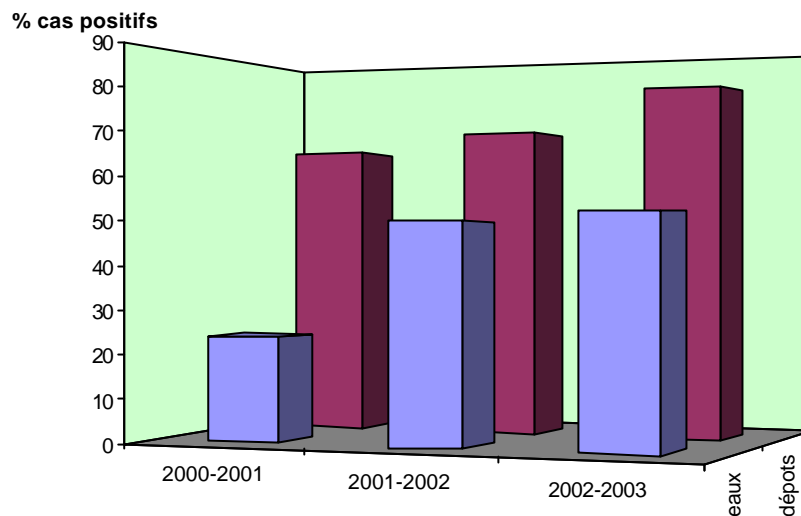


Figure 5: évolution des cas positifs des humidificateurs étudiés au cours de trois saisons de chauffe successives.

According to the results obtained, it appears that the concentrations in ergosterol in water are in ppb level and, in the deposits, in ppm level.

The quantities of ergosterol measured in deposits during season 2002-2003 are relatively higher than those measured during the two other seasons. The recorded peak is: 15 µg/g M.S (season 2002-2003, second part of heating) for a "pulverisation" type group. This type of humidifier present higher quantities of ergosterol compared to "the Amazon" type. These results are probably due to the difference of conception.

The recorded values in ergosterol are in general higher from January to March for the three years. It is also the period during the highest fluctuations are observed. We noted that the maintenances of the humidifiers tanks were often made less regularly towards the end of the heating seasons.

The various campaigns allowed to define values centile mentioned in the tables below which show coherence and an increasingly precise definition according to analyses number.

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

The contents in ergosterol corresponding to the calculated centiles from one season to another are well confirmed if the totality of the samples is integrated (N = 162). This is especially valid for deposits. A provisional "cleanliness" scale (table 17) is made up on basis from centiles 50, 75 and 90, calculated for deposits. In the future these values should be confirmed on the basis of more numerous samplings.

This scale can constitute a tool of decision-making aid very interesting for the persons in charge of maintenance as well as for the attitudes to be taken for the preventive or corrective actions.

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

Brassicasterol

As presented here above, black yeasts belonging to the genus *Exophiala sp.* and *Phialophora* are among the most frequent genus found in the humidifiers. A thorough analysis of constitutive sterols in 12 strains of this species coming from the collection of ISP (BCCM/IHEM) in order to seek its specific tracer was made. Indeed, it is particularly interesting to be able to detect it relatively quickly and to identify it. The traditional microbiological methods require more than 15 days of incubation to have an easily observable culture for *Exophiala jeanselmei*. Let us remind that the current taxonomic elements remain still extremely broad to discriminate these 2 genus.

In all cases, a molecule called brassicasterol was detected. Its occurrence was confirmed by a series of spectrometric investigations (Hplc-ms and GCMS). Indeed, the mass spectra recorded in GCMS correspond to structure hypothesis which were recently confirmed with Hplc-ms (Figure 6 and 7). The ergosterol ($m/z = 379$) is distinguished perfectly from the brassicasterol ($m/z = 381$).

It should be specified that in parallel, analysis of sterols resulting from various moulds belonging to the *Cladosporium* genus, *Penicillium*, *Fusarium*, and *Alternaria* genus did not reveal of brassicasterol.

In conclusion, the measurement of the ergosterol contents is a "quantitative" tool making it possible to evaluate the microbiological quality of humidifier water. In addition, the detection of brassicasterol in the extracts accounts informs of the occurrence of *Exophiala* and *Phialophora*.

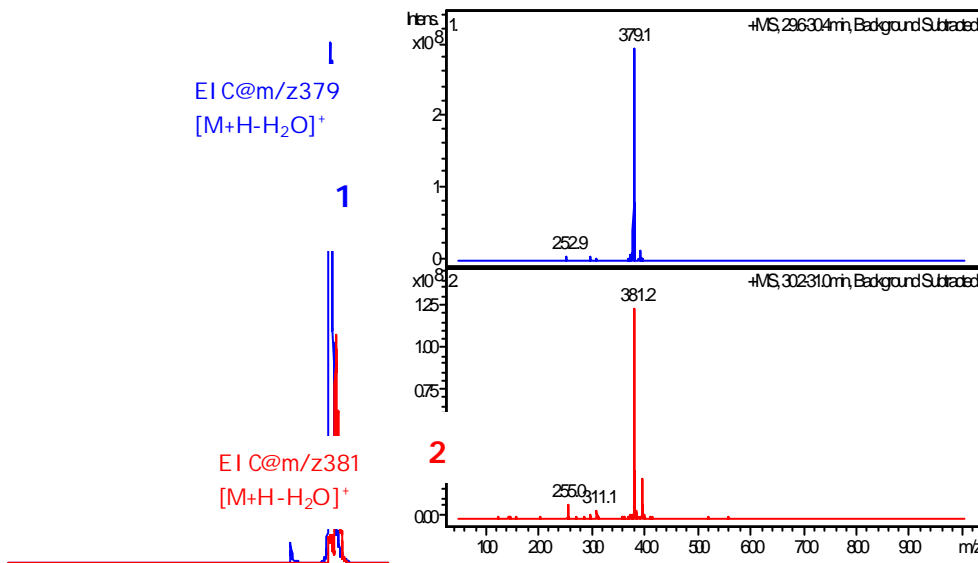


Figure 6: EIC (m/z 379) et EIC (m/z 381) en mode APCI (+)

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

Endotoxins in water of humidifiers tanks

Forty humidifiers water were analysed with the LAL kinetic chromogenic method. A "scale" with centiles values was calculated and is presented in table 18.

Tableau 18

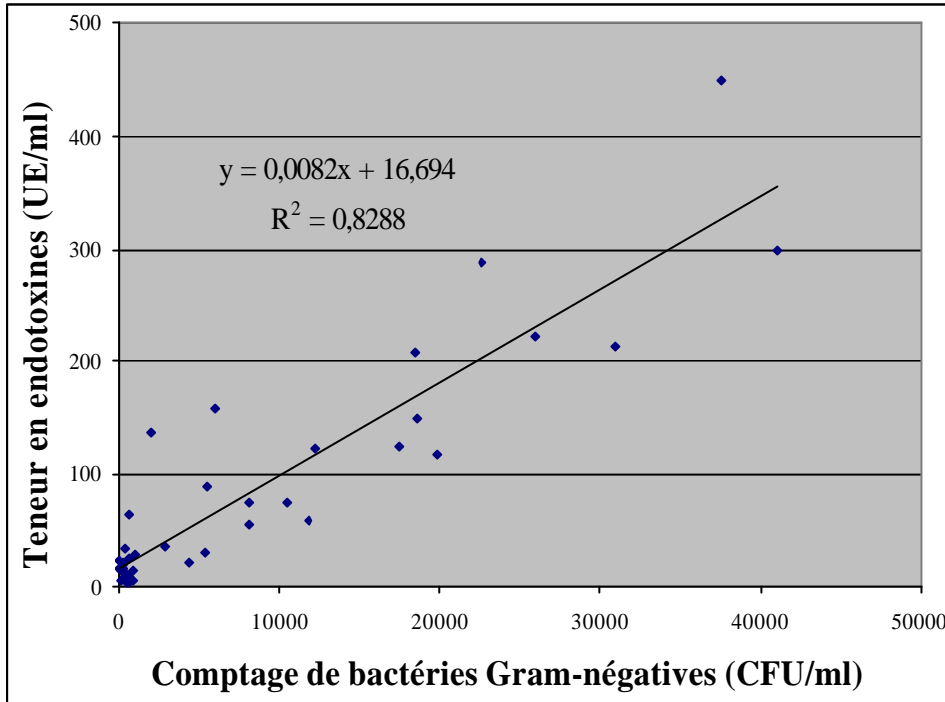
Eau humidificateur - Endotoxins		
Centile	Valeurs calculées	Valeurs arrondies retenues
25	18	
50	46	50
60	75	
70	107	100
75	146	
90	298	
95	549	>500
En unités UE/ml (Unités d'Endotoxins par ml) 10 UE/ml = 1 ng/m		
n = 43 données		
Max = 2.005 UE/ml		

Tableau 19

Tableau x : proposition d'un outil d'aide à la décision en fonction de la concentration en endotoxins 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

Countings of Gram - bacteria (in CFU/ml) and the respective contents of endotoxins (in UE/ml) of 43 studied water are examined on figure 8: a linear trend ($R^2 = 0,8288$) is observed.

Figure 8

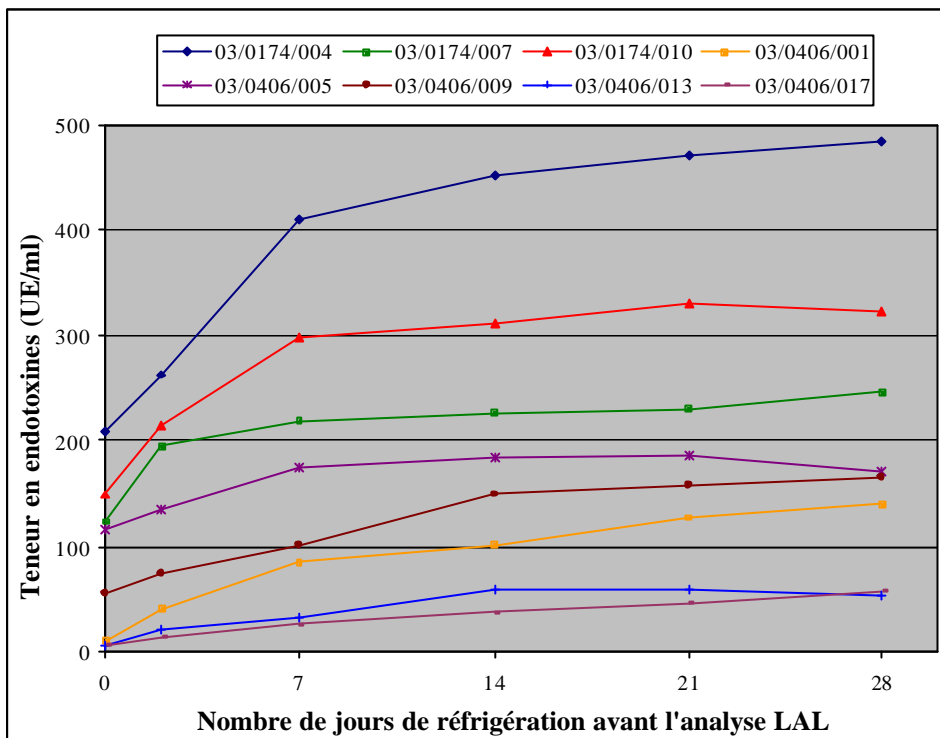


Water refrigeration effect on their content in endotoxins

The follow-up of the evolution of endotoxins contents in 8 cooled waters has been done. For each water, the quantification of the endotoxins by LAL chromogenic method, based on the reaction time to reach an optical density of 0,3, was realised in a similar way after one weekend, one week, two weeks, three weeks and a month of refrigeration. (See Figure 9)

A rather significant increase in the content of endotoxins (UE/ml) in water has been observed. This tendency is marked mainly at the end of the first week of refrigeration where the contents of endotoxins found has increased by a factor 8 compared to the initial contents. During the last three weeks, the contents of endotoxins reached a stage, undoubtedly with the effect of the refrigeration which slows down the growth of the Gram- bacteria present in water. At the end of the analysis, after one month of refrigeration, it appears that the contents of endotoxins water exceed from 1,5 to 14 times compared to the initial results. As it is seen, this multiplicative coefficient varies very strongly from one sample to another. So, we firstly conclude that the quantification of the endotoxins in water by LAL method should be realised as soon as possible after sampling (and of course in the case where a freezing is not considered).

Figure 9



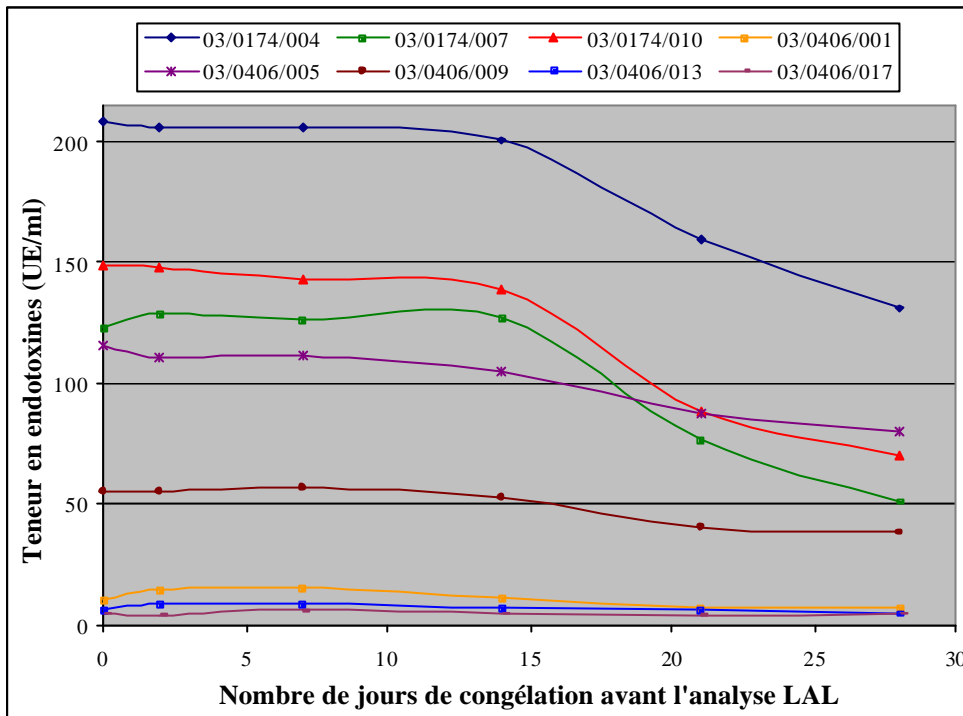
Water freezing effect on the content of endotoxins

Same water samples that for the preceding paragraph were used to test the effect of the freezing of humidifiers water (temperature: - 20°C) on their content in endotoxins (UE/ml). Quantifications of endotoxins are again realised after one weekend, one week, two weeks, three weeks and a month of freezing (See figure 10).

The main element to be highlighted concerns the remarkable constancy of the endotoxins contents in water during the first two weeks of freezing. On figure 34, this fact is clearly marked for the whole of studied water, by the plates observed up to two weeks.

The period which followed reveals a rather clear reduction in the contents of endotoxins. The maximum loss observed is 59 % (compared to the initial content).

Figure 10



IV.2.1.2. Air in offices

Bacteria

We calculated, for airborne bacteria, several centiles with the results obtained during 166 microbiological investigations realised in buildings equipped with air conditioning. Expressed in CFU/m³, these centiles give a scale showing a level of contamination in airborne bacteria. But, these values are not correlated with health problems.

Tableau 20

Centiles	Extérieur	Extérieur	Intérieur Ambiant	Intérieur Ambiant	Intérieur Pulsion	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

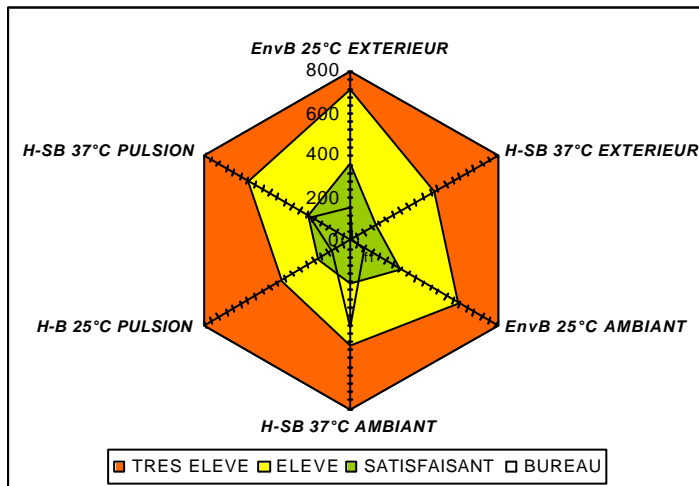
EnvB: Mesophilic Environmental Bacteria; H-SB: Mesophilic Human-Source Bacteria

To facilitate the results interpretation, a graph is used. Three levels of bacteriological quality, according to the calculated centiles are delimited on the background of this graph to be used as

references: GOOD (below centile 75), HIGH (between centiles 75 and 95) and VERY HIGH (above centile 95). The results are written on 6 axes corresponding to HSB (Human source Bacteria) and EnvB bacteria (Environmental Bacteria) isolated on 3 strategic places: outside; at the pulsion mouth and ambient air.

It is important to specify that these levels of quality are not correlated with a level of health risk. However precautions can be taken in the event of high contaminations.

Figure 10



On the graph 10, the H-Sb bacteria load in the ambient air is high but weak at the pulsion mouth in the office and outside. So, these results indicate an "over-crowded" environment and/or insufficient ventilation in the office.

Airborne moulds

For the airborne moulds, several centiles were calculated based on the results obtained during 166 microbiological investigations realised in buildings equipped with stations of air conditioning. Expressed in CFU/m³, these centiles give a scale showing the level of contamination.

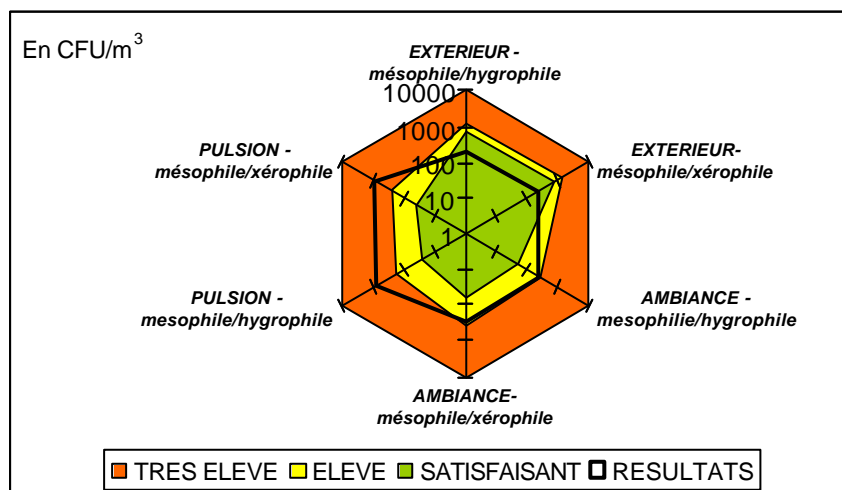
Tableau 21

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.

To facilitate the results interpretation, a graph is used. Three levels of fungal quality, selected according to the calculated centiles are delimited in background of the graph to be used as references: GOOD (below centile 75), HIGH (between centiles 75 and 95) and VERY HIGH (above centile 95). The results are deferred on 6 axes corresponding to the 2 categories of required mesophilic micro-organisms isolated on 3 strategic places: outside, at the pulsion mouth and in ambient air.

Figure 11



On graph 11, the moulds concentration at the pulsion mouth is higher than outside what can show a contamination somewhere in the installation. The identification of the moulds is justified in this case to complete the diagnosis.

IV.2.1.3. Dust deposited on a horizontal smooth support

Several centiles were calculated based on the results obtained during 166 microbiological investigations realised in buildings equipped with air conditioning. Expressed in CFU/dish, these centiles give a scale showing the level of contamination in moulds.

Tableau 22

Centiles	Appreciation	Bacteries 25°C	Bacteries 37°C	Moisissures 25°C	Moisissures 45°C	Actinomycetes 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

The identification of moulds and, in some cases, of bacteria, is essential to complete the diagnosis.

IV.2.1.4. Dust in carpets

Moulds

239 dust samples were analysed at ISP. The results permit to calculate again the centile values. 90 % of the analysed samples were under the threshold of 100 CFU/mg calculated previously. Less than 5% presented excessively high values revealing a serious contamination.

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

Ergosterol

In parallel, some samples were analysed by ISP and FUSAGx. Table 24 did not show correlations between ergosterol concentration and the revival fungi.

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

N° échantillons n°enq/FuSAGx - ISP	Moisissures Mésophiles CFU/mg	Moisissures Xérophiles CFU/mg	Contaminant CFU/mg	Ergostérol CFU/mg
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, LIBRARY

Contaminated archives, books and other documents may present a risk for people who handle or remove them. Two cases were examined. The first case concerned a rather serious fungal contamination of invaluable books. In addition to the damage caused on these books, the health risks for the people working in these buildings have been evaluated.

The second case concerned archives contaminated in a bank building. After evaluation of the health risks for the workers, we followed in time the contamination after several successive cleanings of the shelves and the rooms.

VI.2.2.1. Library and invaluable books

On bindings, the dominant moulds were *Penicillium*, and *Trichoderma*. In the air, *Penicillium* spp., *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ustus* (often more than 1 500 CFU/m³) presented the higher concentration.

VI.2.2.2. Bank building, archives rooms

Mycological analyses of the air were realised following a water infiltration involving fungal developments on archives, and mainly with high concentration of a cellulolytic moulds: *Chaetomium*. After the first report, cleanings of the shelves were done, which involved an increase of spores in air. It is only after the third cleaning that the situation has improved.

We followed the evolution of spores concentration and especially *Chaetomium* concentration after several cleanings. Several successive cleanings were necessary to come back to a satisfactory situation.

IV.2.3.. INDUSTRIAL ENVIRONMENT :

IV.2.3.1. Metallurgical industries, metal working fluids

Microbiological analyses of metal working fluids

Specific samples analyses

Metal working fluid samples were analysed at ISP. One of the samples contained a high concentration in *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

Study of a metallurgical site

As for the preceding series of measurements, in straight oils no bacteria and/or mould grew on the respective culture media. This well confirms the absence of ergosterol and the low values in endotoxins found in these oils.

In the samples taken in May 2003, the total count of bacteria (at 25°C and 37°C) and Gram-bacteria (at 37°C) of 2 "used soluble oils" were impossible to realise because the number of developed colonies was too high, even with the highest dilutions.

Among the samples taken in October 2003, only synthetic oil remained extremely contaminated while semi-synthetic oil presented a strong reduction of contamination. However, we found out for the 6 investigated metal working oils an excellent correlation between the various measured parameters (chemical (endotoxins and ergosterol) and microbiological data (counting of the Gram- bacteria and moulds)).

During this period, a semi-synthetic oil sample contained 6 000 000 CFU/ml of Gram- bacteria. This sample also presented the highest contents of endotoxins (more than 76.944 UE/ml).

Ergosterol quantification in metal working fluids

Preliminary analyses

The results of the quantification of the ergosterol obtained for sample 5 confirm the presence of moulds.

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

Study of a metallurgical site

The results of quantifications of ergosterol were negative and confirm the absence of moulds (alive and dead) in the samples taken on this site.

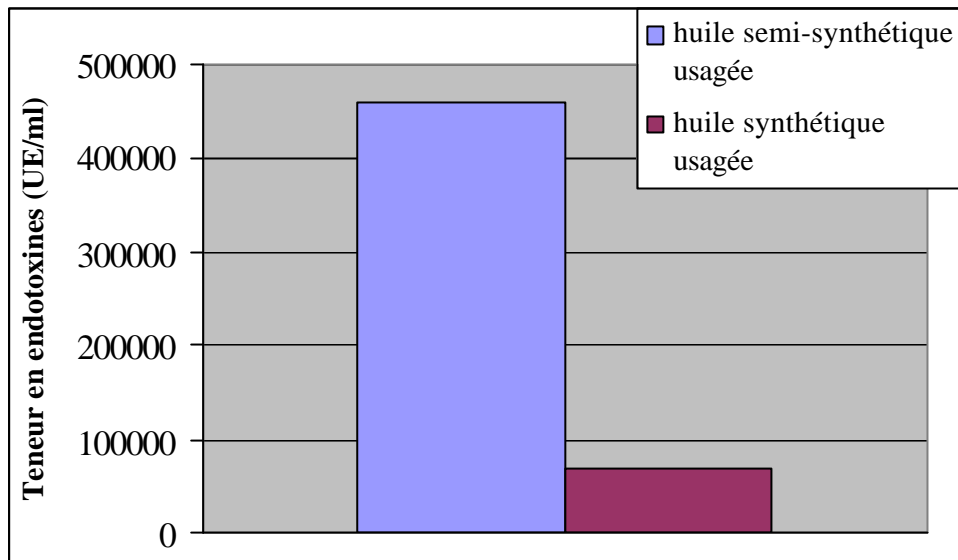
Endotoxins quantification in metal working fluids

Preliminary quantifications and finalizing

Preliminary quantification of endotoxins in 6 metal working oils was realised by the kinetics chromogenic (405 Nm) and "end point" methods with diazotizing coupling (545 Nm). Analysis protocol the same as one used for water except that these oils required more dilutions. Note that 2 straight oils were beforehand diluted twice with Tween 80 at 0,01 % (in order to facilitate the operations of dilution).

As first conclusion, we noted that straight oils presented a weak concentration in endotoxins (12 UE/ml). On the other hand, 2 soluble metal working fluids (the synthetic one and even more the synthetic one) showed contents very largely higher than 500 UE/ml (high concentrations proposed in table 18 for humidification water).

Figure 12



Study of a metallurgical site

One site (metallurgical industry) was investigated (see appendix B).

The quantification of endotoxins in metal working oils was done by kinetic chromogenic method (based on the reaction time to reach an optical density equalizes to 0,3). During the first series of measurement in October 2003 (Table 1, appendix B), one observes that the contents of endotoxins found in 2 straight oils (used and unused) are very low (0 UE/ml) but logical: these oils, completely deprived out of water, are not favourable for bacterial propagation. On the other hand, the contents found soluble oils (semi-synthetic and synthetic oils) remain very high (respectively 3 350 UE/ml and 28 235 UE/ml) but less than during the previous series of measurements, and much higher than those obtained in their not used equivalent (0 UE/ml). During December 2003 measurements (Table 2, appendix B), a semi-synthetic oil sample was containing more than 76 944 UE/ml.

IV.2.3.2. Synthetic fibres manufacture

In this case, climatic conditions for the specific process require very humid conditions (> 90% of humidity). The analyses of surfaces realised on the walls indicated the presence of: *Fusarium spp.*, *Acremonium*, yeasts, *Phoma*, etc. In the humidifiers, we isolated high bacteria (max: 7 960 000 CFU/ml) *Thermoactinomyces vulgaris* level (sometimes more than 13 CFU/ml). Moreover, many air analyses were realised and results are sometimes extremely high (max. bacteria 25°C: > 2 400 CFU/m³). In conclusion, the microclimatic conditions are favourable to very diverse microbiological contaminations, what places this sector in our priorities.

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. LABORATORY USING FUNGAL BIOMASS

A laboratory was selected. Contaminated cereals with *Fusarium* spp. and *Alternaria* spp. are handled. These moulds are known to cause allergic reactions to certain people. They also produce mycotoxins among deoxynivalenol, altertoxin I and II, alternariol, acid tenuazonic, etc. RCS+ and Impigers were used to realise air samplings in 4 different rooms: a room where cereals are grinded; a contaminated grains handling room, a room of incubation for growth of moulds and an apple conservation room located in the same building. The follow-up of this site was planned to look for the possible occurrence of moulds produced by fruits rotting.

In this case, all the samplings revealed negative with the 2 methods.

IV.2.5. BUILDING CONSTRUCTION SECTOR

IV.2.5.1. New materials containing recycling products

A. In this sector, new materials made with natural products as vegetal wastes are more and more used. On plant material, microbiological contaminations are never excluded and can constitute a health risk for the workers.

Plant fibres, used for the isolation of floors or for the manufacture of building pannels, were analysed at the laboratory on the request of this product manufacturer of the product. The fungal analyses results of the primary product showed the presence of specific moulds in some samples, in particular xerofilic species like *Wallemia sebi* and *Aspergillus glaucus* gr..

B. In this sector too, air analyses were realised during a fungal decontamination in a dwelling. The workers are particularly exposed as well by moulds as by products of disinfection used.

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. Buildings disinfection and decontamination

We followed cleaning and decontamination operations on sites contaminated by moulds. The aim was to evaluate possible workers exposition to moulds.

With the traditional microbiological method, the results are higher in the room (see below). The quantification of ergosterol method is not sensitive enough to bring useful information.

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. AGRICULTURAL SECTOR

Air samplings were realised in flour mills. In this kind of industry, wheat is cleaned, dried, grinded and sifted to give flour. During all the process of transformation of the grains into flour, from transport to the conditioning of the finished product, the risk of a contamination is always possible.

We focused on the grinding room. Indeed, during the grinding of the grains high level of aerosols can be inhaled, what presents a risk for the workers health.

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	+

In this case, the microbiological method was more sensitive than the chemical one. Moreover, no correlation between the results appeared.

V DISCUSSION

Valorisation of the research project: trends and perspectives

The research allowed by the BFSP0 generated a fruitful partnership between ISP and FUSAGx. Jointly undertaken work led to the development of procedures aiming at more confident measurement of the bio-contamination in workplaces and was directed towards the establishment of (provisional) guide-values (GV). In this chapter, the potentialities of valorisation of the programme actions are highlighted within two related topics: the first one suggests complementary research orientations to target and the second takes into account some more general considerations as regards the management (eg. measurement – evaluation of the risks for human health – remediation) of the "indoor and workplaces pollution" in Belgium.

§A. Suggested complementary actions and research orientations

At the end of the present 3-years programme several new and complementary trends may be underlined. Indeed, during the successive steps of the investigations tendencies became apparent in the two complementary methodologies which supported the research activities: microbiological and bio-chemical evaluation of the contamination. Some considerations may be non exhaustively gathered:

1. The developed pre-normative procedures should be up-graded to a "directive level". Therefore, it should be mandatory to validate them through circular tests with experienced laboratories and including statistical aspects. The proposed methodologies should be clearly presented (and detailed) in standardised forms accessible to the scientists / authorities in charge of the indoor and workplaces pollution.
2. The systematic improvement of the data bases which support the suggested GV. Moreover, in addition it would be necessary to initiate more analytical campaigns in more diversified environments (Within the present research and at the request of the occupational medicine, it was occasionally possible to investigate contaminated areas). In future developments it should be very useful to evaluate the risk for health in very contaminated workplaces. Such an "analytical approach" might be systematically linked to medicinal diagnosis. To do so, a concerted research "task-force" should closely combine the interdisciplinary efforts of medical, microbiological and biochemical teams integrated within a thematic network. This perspective would focus on the prevention aspects.
3. As suggested above, the substantial progress made during the project should be considered as a template for future methodological and data acquisition developments which surely could increase the efficiency of the monitoring tools and aids to the decision. To do so, the search of micro-organisms in specific environments and a more accurate detection of selected compounds as MVOCs, mycotoxins and endotoxins – used both as bio-indicators and as noxious substances – should be developed. In this respect, new high-tech equipments (thermo-desorption GCMS and Ion-trap LCMS have recently been acquired by the FUSAGx partner and therefore would allow meeting these concerns more effectively).
4. Recent published studies showed that there can be associations between bacteria and moulds. This suggests another promising field of investigation which could be retained. Again, potentialities of the mycologist, the bacteriologist and the chemist would find an accurate complementarity.

The previous suggestions are not strictly exhaustive, neither organised into a hierarchy. They emerge from reflections highlighted by the results of research and the experience acquired during the project. It appears to the partners that there is an unquestionable interest to proceed

in the traced way because the socio-economic implications of the bio-contamination is directly related to the wellbeing at work and raises of a facet of the public health.

In term of continued actions, various other tendencies are released: the implementation-actualisation of the bibliography treating of the subject, the maintenance of the www.indoorpol.be website and – last but not least – the information and the diffusion of the results.

§B. General considerations on the activity in "indoor pollution" at the Belgian level

The impact of environmental pollution is currently regarded as a real world-wide scourge. The great conferences inter-states which were taken place these last years clarified of many changes and risks for humanity and ecosystems.

The bio-contamination related problems have two main origins: the first concerns the microbiological quality of food, which falls within the competence domain of the Belgian federal agency of food safety; the second regards the indoor and workplaces pollution.

Various reflections led us to consider these problems under a more global perspective of development.

The questions of contaminations in the indoor environments were largely mentioned in connection with the incidence of the allergy or relating to increasingly frequent infectious diseases, such as the legionellose. Nevertheless, the understanding of the cause-effect relationship is a complex multifactorial task. Indeed, the link between the occurrence of a health problem and the detection of potentially noxious micro-organisms are extremely complex and particularly delicate in workplaces. Biotic, abiotic, and even psychological factors have to be integrated in a global analysis of the problem. The implementation of a reflection-action on this subject implies a multipurpose approach which requires, at the same time: research, information and popularization, sustained by a federal regulation. In a long term perspective, the coordination in this matter should, in the long term, lead to the establishment of a federal structure joining together scientific, medical and juridical teams, leading to a dialogue within the work context.

Taking into account of the already established structures, and in the respect of balances at the federal level, a centralised research template would be, following the example of other countries, suitable to continue the researches in the field of the indoor places bio-contamination. It would be a federal structure of reference which would have as essential prerogative methodological research, the development of interlaboratory tests as well as the participation, in its own field, in the activities of the Belgian Institute of Standardisation (IBN). This unit could on the one hand provide standardised protocols to the organisations which ensure the interventions and the diagnoses, and on the other hand to ensure targeted actions of popularization and information.

Due to its role of relay and specific activities, the centralised template suggested above could become an interlocutor at the European level.

VI. APPENDICES

Huiles de coupe (OCTOBRE 2003)											
Echantillons d'huile		Données chimiques				Données microbiologiques					
Référence	Type d'huile	Concentration en endotoxins (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)	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 endotoxins (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: . . /																			
<u>Symptoms</u>	Check ○ 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	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ rhinitis	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ sneezing	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ dry throat	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ headache	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ drowsiness	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ fatigue (overwhelming)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ respiratory problems	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ asthma	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ flu-like symptoms	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ fever	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ skin problem	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ hypersensitivity pneumonitis	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ Legionnaire's disease	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ other	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Health improving is observed																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
<u>during:</u>	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ week-end	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ holiday longer than a week	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ every beginning of the week	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ at a precise period of the year	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ other	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Symptoms may appear:																				
✎ at home	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ in the car	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ in the train	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ during sports activities	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Work area is:																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
✎ open-plan office	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ individual office	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ area without window	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ archives	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ car (commercial activity)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ cluttered room	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ other	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	other observations:																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
✎ you are a smoker	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ non smoker, with smokers	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ working on a computer	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ difficult relations with co-workers	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ stress, extra load of work	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
✎ uninteresting job	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	Localisation																				
Area identification	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Corresponding pulsion group																					
<u>Remarks</u>																					
.....																					
.....																					
.....																					
.....																					

Figure 2

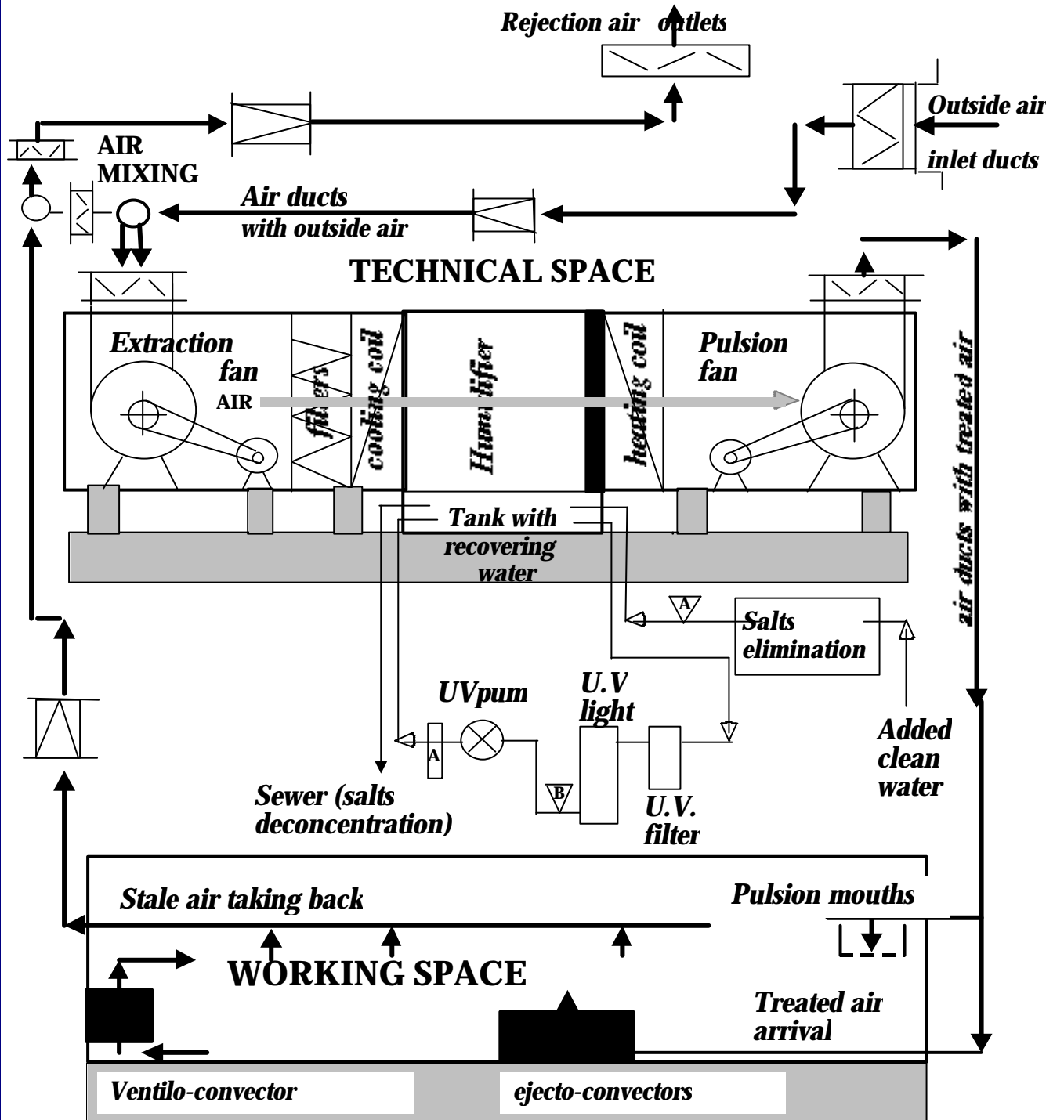


Figure 3

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"/> flok 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"/> Ojectoconvectors: 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.

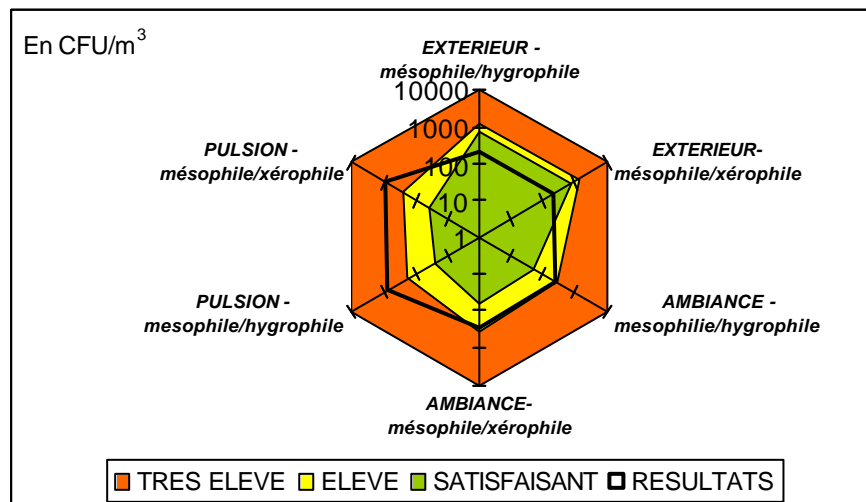
6. GUIDELINES ISP-MYCOLOGIE

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.

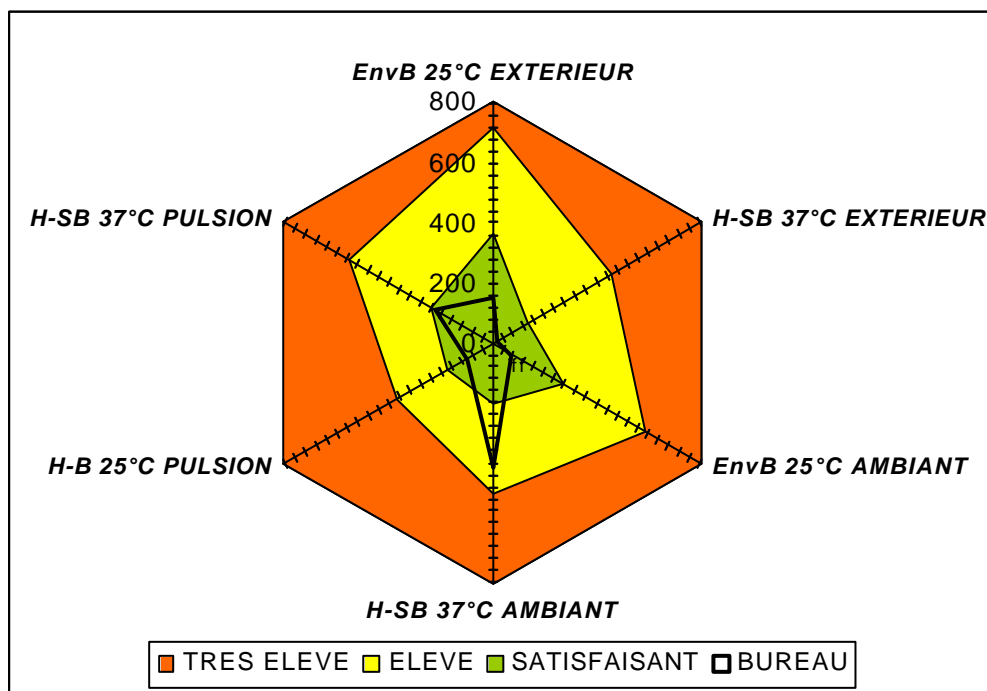
6. GUIDELINES ISP-MYCOLOGIE

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 Ambiant		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



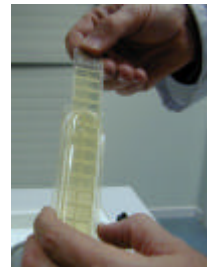
1. RCS+, de Biotest



2a. Ouverture de la tête du RCS+



2b. Ouverture de la tête du RCS+



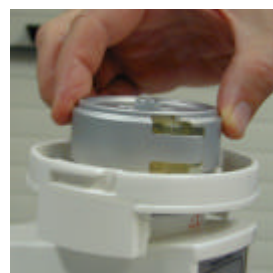
3. Une languette de milieu gélosé est soigneusement retirée de son étui stérile



4a. La languette est introduite dans la tête amovible



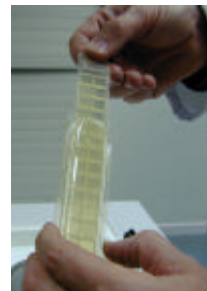
4b. jusqu'au guide métallique, le milieu gélosé orienté vers l'axe central



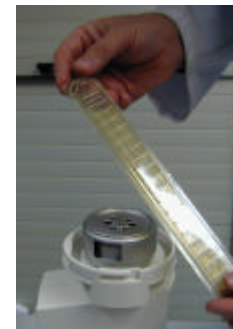
5a. Dès que le prélèvement d'air a été effectué, la tête amovible est dégagée



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

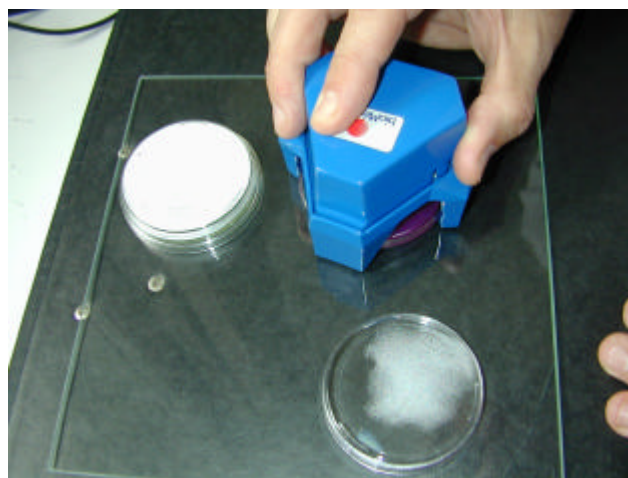
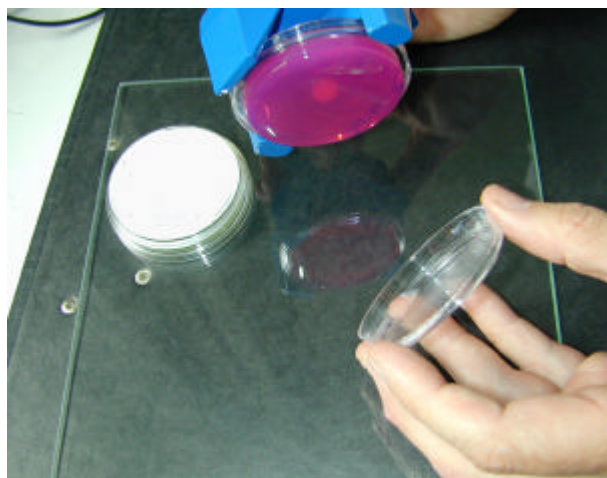
Microbial analysis of deposit dust on surfaces in Buildings offices equipped with central air-conditioning installations: proposed microbial practical values with a new standardized method

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'autres, 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 jeanselmei* 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

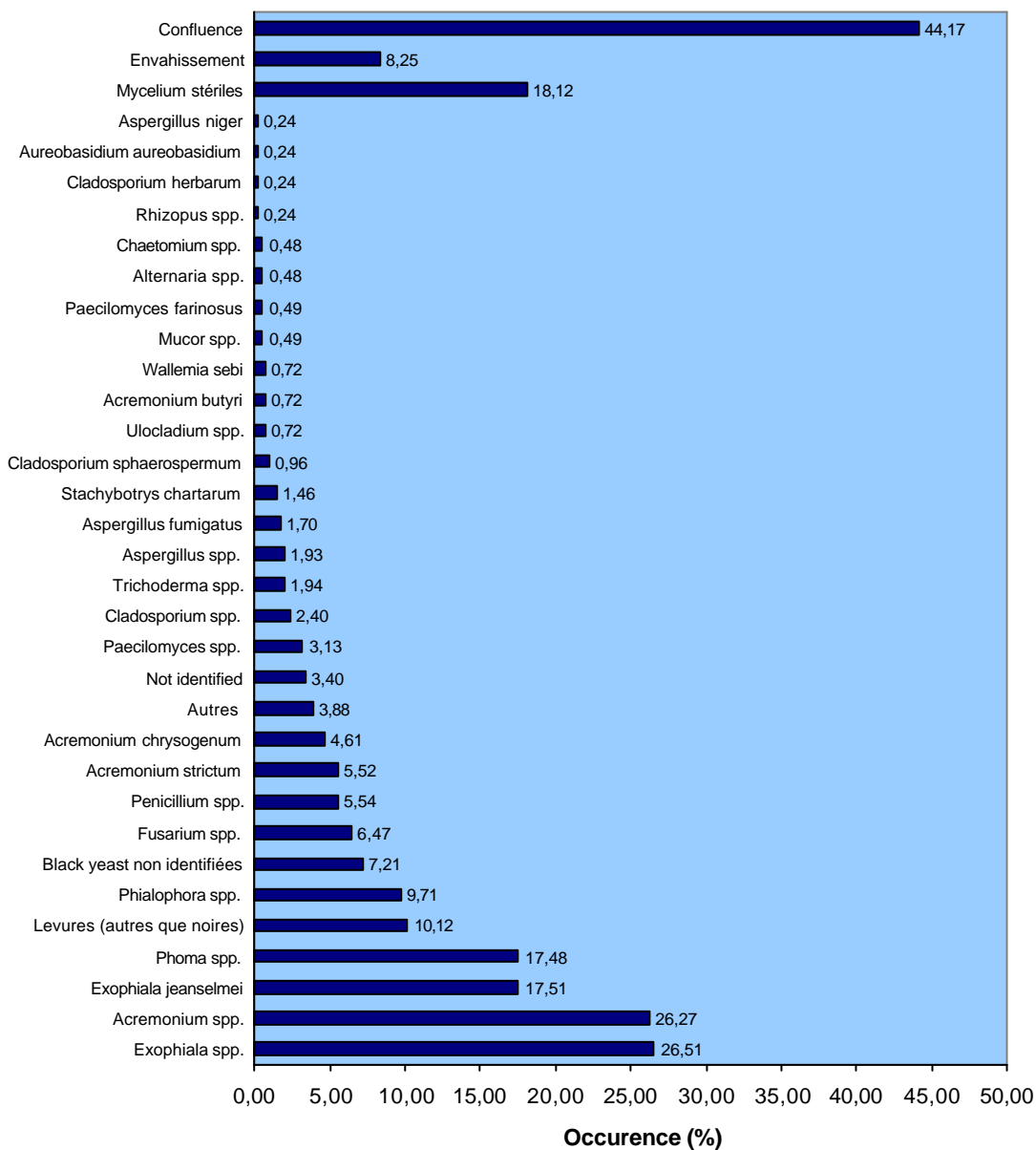
8. LIMITES D'INTERPRETATION

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.

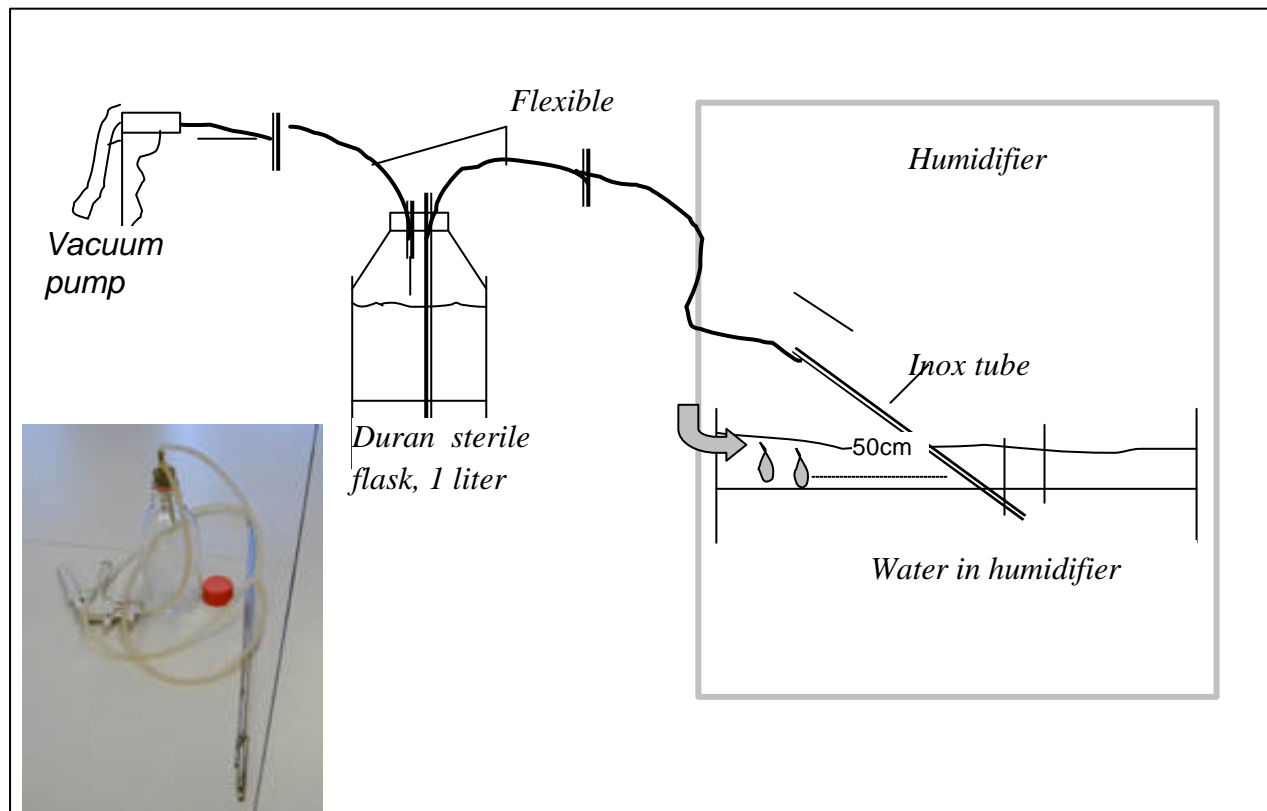
L'échelle de centiles donnée au §7 n'a pour objectif que de se situer par rapport à d'autres humidificateurs dans des bâtiments similaires ce qui peut constituer un outil d'aide à la prise de décision pour les responsables de la maintenance quant aux attitudes préventives ou curatives à mettre en œuvre. 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 filtrate », (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:

Germe recherché 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)

Germe	Milieu gélosé	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) →



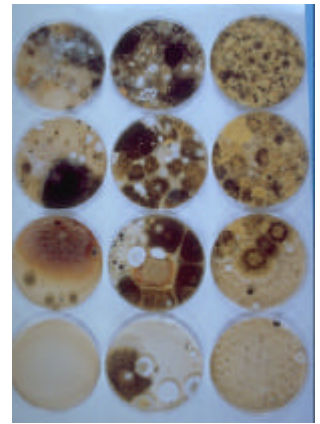
8. Le filtre est retiré de l'embout après l'échantillonnage



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



**Institut Scientifique
de la Santé Publique**

**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

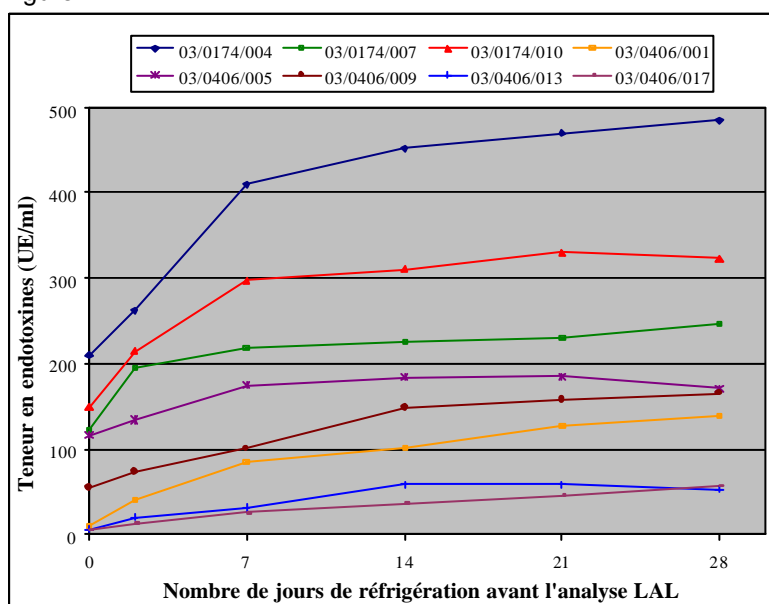
Effet de la réfrigération des eaux sur leur teneur en endotoxines

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.

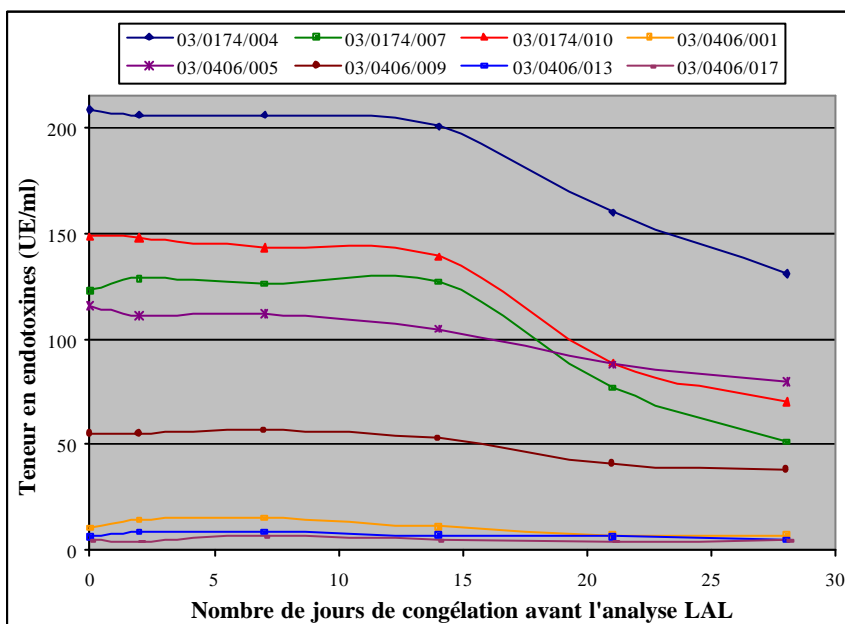
Les dosages d'endotoxines sont de nouveau réalisés après un week-end, une semaine, deux semaines, trois semaines et un mois de congélation.

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

QUALITE MICROBIOLOGIQUE DANS LES BATIMENTS A BUREAUX EQUIPES DE CONDITIONNEMENT D'AIR:

Dosage de l'ERGOSTEROL dans les eaux et les dépôts d'humidificateurs de systèmes de conditionnement d'air.

Fiche de recommandations

FUSAGx-ISP/AC08

Dernière mise à jour le
20/02/2004

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

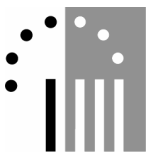
Supérieur à 90 : identifier et solutionner le problème 15j après une opération de maintenance complète.

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

Published by the
Belgian Science Policy

For more informations:

Madame E. Bourgeois
Belgian Science Policy
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

Neither the Belgian Science Policy nor any person acting on behalf of the Belgian Science Policy is responsible for the use which might be made of the following information. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without indicating the reference.