

ARTICLES

Spores de moisissures en air intérieur : cas d'un bâtiment en Guadeloupe

Mold spores in indoor air: example of a building in Guadeloupe

Vanessa CLOTAIRE¹, Jack MOLINIE¹, Olivier GROS², Rose-Hélène PETIT¹

Résumé

La pollution de l'air intérieur est devenue depuis quelques années une préoccupation sanitaire majeure. En environnement chaud et humide, l'air ambiant favorise la prolifération de moisissures à l'intérieur des bâtiments. Ceux-ci émettent des spores de taille microscopique qui peuvent constituer un danger pour la santé.

Dans un entrepôt de la Guadeloupe (climat tropical et humide), des problèmes de santé se sont déclarés chez le personnel. Une étude de la concentration des particules en suspension dans l'air a été réalisée par comptage optique. L'analyse de la granulométrie a montré des comportements différents des particules suivant leur taille. Pour la gamme [0,3 µm-1 µm[et les tailles supérieures à 5 µm, on observe des pics importants de la concentration lors des heures d'activité humaine. Les concentrations en particules de tailles comprises entre 1 et 5 µm présentent des variations relatives plus faibles lors des heures d'activité humaine. La présence de matière organique sur les étagères en contreplaqué ainsi que les températures et l'humidité relative observées à l'intérieur du bâtiment ont permis de faire une hypothèse concernant la présence de biocontaminants en suspension dans l'air. Suite aux prélèvements sur les surfaces en contreplaqué de substrat organique et à une mise en culture, deux genres de champignons proliférant sur les étagères en contreplaqué ont été mis en évidence : le genre *Aspergillus* et le genre *Penicillium*. L'analyse par microscopie électronique de prélèvements journaliers sur filtre a révélé la présence de spores de moisissures en suspension dans l'air, dans les gammes [1 µm-2,5 µm[et [2,5 µm-5 µm[. Ainsi, les concentrations en particules en suspension pour ces gammes se sont avérées être liées à la sporulation, qui ne varie pas avec l'activité humaine, et à la mise en suspension de particules non biologiques.

Cette étude a montré que dans des conditions tropicales humides, l'utilisation de contreplaqué est susceptible de favoriser le développement de moisissures et de conduire à une contamination de l'air. Des études complémentaires sur ce matériau couramment utilisé pour l'ameublement s'avèrent nécessaires.

Mots-clés

Pollution de l'air intérieur. Particules. Concentration en nombre de particules. Moisissures. Spores.

1. Laboratoire de Recherche en Géosciences et Énergies (LaRGE) – UFR des Sciences Exactes et Naturelles – Département de Physique – B.P. 250 – 97159 Pointe-à-Pitre Cedex – Guadeloupe – France – vanessa.clotaire@univ-ag.fr

2. UMR-CNRS-IRD-MNHN-UPMC 7138 « Systématique-Adaptation-Évolution » – Équipe « Biologie de la Mangrove » – Université des Antilles et de la Guyane – UFR des Sciences Exactes et Naturelles – Département de Biologie – B.P. 592 – F-97159 Pointe-à-Pitre Cedex – Guadeloupe – France.

Abstract

During the recent years indoor air pollution has become a major health concern. In hot and humid environment, ambient air promotes mold growth indoors. They produce microscopic spores that constitute a health hazard.

In a store house of Guadeloupe (tropical and humid climate), health problems of the staff have been reported. Concentration measurements of airborne particles by optical counting showed two behaviors depending on the particle sizes. Between 0.3 and 1 μm and above 5 μm , we observed important peaks in concentration during human activity hours. For particles between 1 μm and 5 μm the concentrations showed lower and quasi-constant relative variations. To explain this behavior, suspension of particles by human activity did not appear as the main process. The presence of organic matter on the shelves made of plywood and the temperature and relative humidity observed inside the building suggested the presence of bio-contaminants in the air.

.../...

Subsequently, we analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM), samples of substrate present on the plywood shelves: we detected mold. The Bacto Yeast Extract culture media allowed us to determine two types of fungi that proliferated on the plywood shelves: the genus *Aspergillus* and the genus *Penicillium*.

Then, we collected airborne particles on filters with pump device. SEM images of collected particles revealed the presence of biological particles (spores, hyphae and mycelium fragments), mineral particles, soot and paper dust. Among the particles collected on filter in the ranges of sizes [1-2.5] and [2.5-5 μm], we found mold spores. Thus, the concentrations of suspended particles in these ranges were found to be related to the suspension of non-biological particles during the hours of human activity in the building and sporulation over the entire period of measurement.

This work suggests that under tropical humid environmental conditions, the use of plywood is apt to promote fungi growth and lead to indoor contamination. Further studies on this material commonly used for furniture are needed.

Keywords

Indoor air pollution. Particles. Number concentration of particles. Molds. Spores.

1. Introduction

La pollution de l'air intérieur est devenue, depuis ces dernières années, une préoccupation majeure pour la santé publique, en raison des maladies qu'elle semble provoquer. Les particules fines, quelle que soit leur origine, biologiques (bactéries, virus, pollens, spores fongique...) ou minérales (argile, silice...) sont partie prenante de cette pollution [1]. Parmi les particules en suspension, celles qui sont de diamètre < 10 μm pénètrent plus profondément dans le système respiratoire et constituent un danger pour la santé [2]. De nombreuses études ont montré le rôle des activités humaines dans la génération et la mise en suspension des particules en environnement intérieur [3-4]. D'autres études ont mis en évidence les problèmes liés à la dispersion des particules pour différents systèmes de ventilation rencontrés dans les bâtiments [5-6]. La génération, la mise en suspension et la dispersion sont des paramètres importants pour l'évaluation des risques sur la santé.

Toutefois les particules de diamètre < 1 μm ne sont pas suffisamment prises en compte dans les normes en concentration massique utilisées pour les risques dans les espaces de travail. Le nombre et la surface particulaires pourraient être de bien meilleurs indicateurs que la concentration en masse, ce qui constitue un problème émergent en matière de contrôle, comme le souligne Pène et Masse (2009) [7].

Or, de plus en plus du fait de leur grand nombre, elles apparaissent comme responsables d'incidents de santé graves [8-9].

Dans notre étude, nous traiterons un cas de pollution particulaire en air intérieur en Guadeloupe, où le climat tropical humide apporte une spécificité à ce type de pollution. En janvier 2009, un établissement public a fait appel au Laboratoire de Recherche en Géosciences et Énergies, suite à des plaintes du personnel. Celui-ci est affecté à un entrepôt d'archivage de documents en papier. Il souffre d'allergies et de problèmes respiratoires. Le Laboratoire a eu pour mission de réaliser une étude sur les concentrations, en fonction de la taille, des particules en suspension dans le bâtiment.

2. Mesures des concentrations en nombre des particules en suspension

2.1 Conditions de mesures et matériel

Le bâtiment est constitué d'un hangar d'une surface de 20 m sur 10 m avec une hauteur sous plafond de 12 m. L'aération est limitée car les deux grandes ouvertures sont situées sur les côtés nord et ouest du bâtiment et les vents dominants sont les alizés (vents d'est). Lorsque le personnel est en activité dans le bâtiment, généralement seule la porte côté nord demeure ouverte, supprimant la circulation de l'air dans le hangar.

La mesure de la concentration en nombre de particules a été effectuée à l'aide d'un compteur de particules Lighthouse HH3016IAQ. Les particules en suspension sont aspirées par une pompe avec un débit de 2,83 l/min. Chaque particule passe dans le faisceau lumineux d'une diode laser et interagit avec la lumière. L'impulsion lumineuse qui en résulte est proportionnelle à la taille de la particule et le nombre d'impulsions pour une taille donnée détermine le nombre de particules. Le comptage optique des particules est donné pour les six gammes de tailles suivantes : [0,3 μm -0,5 μm], [0,5 μm -1 μm], [1 μm -2,5 μm], [2,5 μm -5 μm], [5 μm -10 μm], $\geq 10 \mu\text{m}$. Les particules sont comptées sur une période de 20 minutes suivie d'un arrêt de 10 minutes, soit une mesure toutes les demi-heures. Entre le mardi 13 janvier 2009 à 10 h 06 et le vendredi 16 janvier 2009 à 8 h 18, correspondant à trois jours d'activité du personnel de 7 h à 14 h, 141 mesures ont été enregistrées. Le même dispositif permet d'obtenir en simultané des mesures de la température et de l'humidité relative.

2.2 Données granulométriques

Les courbes obtenues (Figure 1) présentent la variation en fonction du temps de la concentration en nombre de particules pour différentes gammes de diamètres.

On observe une grande variabilité de la concentration avec la présence de pics importants pour les gammes [0,3-0,5 μm], [0,5-1 μm], [5-10 μm] et $\geq 10 \mu\text{m}$. À titre d'exemple, on observe une augmentation de la concentration en particules des gammes [5, 10] et $\geq 10 \mu\text{m}$ entre 7 h et 14 h tous les jours. Ces variations de la concentration en particules de diamètre supérieur à 5 μm semblent provenir de la mise en suspension inhérente à l'activité humaine dans le bâtiment. Pour les gammes [0,3-0,5 μm], [0,5-1 μm], nous observons une augmentation de la concentration avec des pics importants dans des créneaux horaires identiques, de 7 h à 12 h et de 14 h à 20 h, pour les trois jours. Ces variations peuvent être reliées au fait que le bâtiment est situé dans une petite zone industrielle et à proximité d'une route très fréquentée. Les créneaux horaires concernés sont

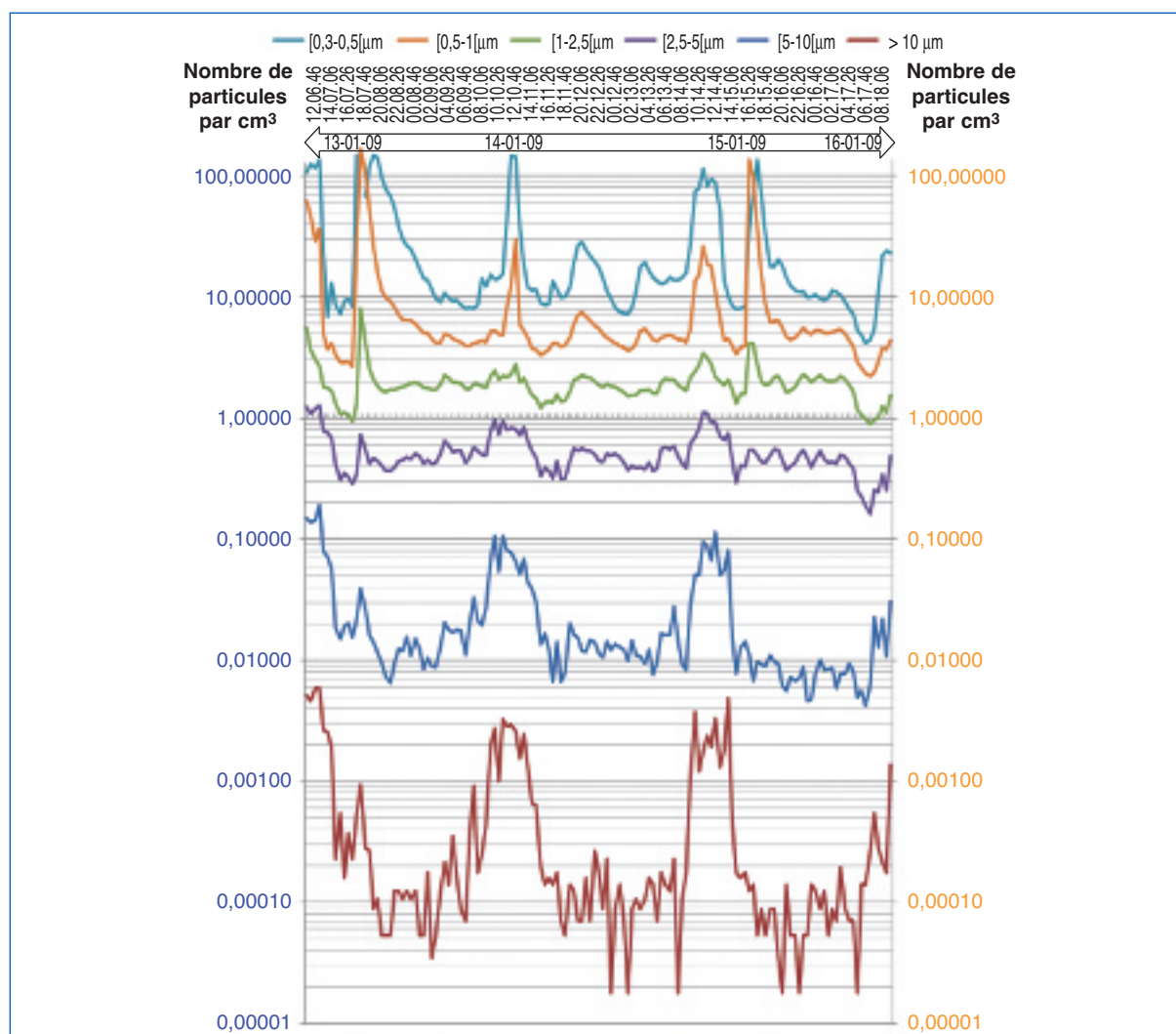


Figure 1.

Concentration en particules pour les gammes de tailles [0,3-0,5], [0,5-1], [1-2,5], [2,5-5], [5-10] et $> 10 \mu\text{m}$.

Particle number concentrations for size ranges [0,3-0,5], [0,5-1], [1-2,5], [2,5-5], [5-10] and sizes larger than $> 10 \mu\text{m}$.

ceux du trafic quotidien maximum. Ainsi, pour les particules de taille inférieure à 1 µm et supérieure à 5 µm, nous pouvons relier la variabilité de la concentration à la mise en suspension des particules par l'activité humaine à l'intérieur du bâtiment et à l'apport de poussières extérieures.

Pour les gammes intermédiaires [1-2,5] et [2,5-5] µm, les variations relatives liées à l'activité humaine existent mais sont de moindre importance. La mise en suspension par l'activité humaine se faisant pour toutes les gammes, les courbes présentant les plus faibles variations relatives indiquent l'implication d'autres processus. En conclusion, pour les particules appartenant aux gammes [1-2,5] et [2,5-5] µm, il existe d'autres facteurs probablement liés à la nature de ces particules responsables de leur présence en concentration quasi constante. Cela nécessite de nouveaux types d'analyses. Nous avons alors effectué des prélèvements sur les surfaces afin de les observer au microscope. Cela a été possible à partir du 2 juin 2009, dès que l'activité normale dans le bâtiment a été rétablie.

2.3 Température et humidité relative

Des mesures de la température et de l'hygrométrie ont été réalisées en parallèle avec celles de la concentration en nombre de particules. La température moyenne dans cet espace est de 24,7 °C et varie entre 22,7 et 27,3 °C. L'hygrométrie dans le bâtiment est élevée avec une humidité relative mesurée variant entre 80 % et des valeurs dépassant les 90 % (limite supérieure de fiabilité de l'instrument).

Les valeurs élevées de température et d'humidité constituent des conditions environnementales déterminantes pour la germination des moisissures. La présence de substances organiques en grande quantité (papier, carton, bois), associée aux paramètres météorologiques ne peut que favoriser le développement de ces organismes microbiologiques [10].

3. Observations au microscope électronique à balayage

3.1 Prélèvement sur les surfaces et observation des boîtes de cultures

Nous avons observé la présence de matière organique de couleurs brune et verdâtre sur les étagères en contreplaqué servant à l'archivage. Cette matière, lorsqu'elle était grattée, entraînait la dispersion de particules dans l'air. Cela signifie que les particules arrachées au substrat par des moyens mécaniques lors de manipulation d'archives, peuvent être retrouvées dans nos données granulométriques. Le contreplaqué retrouvé pour toutes les étagères de l'entrepôt est le seul matériau sur lequel nous avons observé la présence de cette matière organique. Afin de déterminer si elle pouvait être constituée d'une ou de plusieurs moisissures, nous avons effectué des prélèvements sur les surfaces.

L'analyse des prélèvements de matière organique effectués sur les étagères en contreplaqué a été réalisée au microscope électronique à balayage (MEB) Hitachi S-2500 équipé d'un spectromètre X à dispersion d'énergie (EDXS).

Sur la Photo 1, nous pouvons observer un hyphes, dont un ensemble constitue le mycélium de la moisissure (Photo 2). Lors de l'observation du sommet de l'hyphes (Photo 3), nous constatons la présence de spores. La Photo 4 permet une meilleure appréciation de la taille des spores qui va de 1,5 à 3 µm et de leurs spicules. En conclusion, les spores émises par le mycélium prélevé sur le contreplaqué se trouvent dans la gamme intermédiaire (entre 1 et 5 µm). L'analyse dispersive de l'énergie des rayons X nous indique la composition chimique d'un groupe de spores (Spectre 1). Les composants suivants ont été identifiés : carbone, oxygène, sodium, magnésium, aluminium, silicium, phosphore, soufre, chlore, potassium et calcium.

L'analyse directe au microscope électronique à balayage des prélèvements sur surfaces a été complétée par une mise en culture des moisissures [11]. Les prélèvements ont été inoculés sur milieu *Bacto Yeast Extract* (DIFCO) et incubés 15 jours à 24 °C à l'obscurité.

L'identification des moisissures est basée essentiellement sur la forme de l'organe portant les spores. À partir des fructifications observées sur les boîtes de cultures, les spores ont été prélevées par la méthode du « *scotch test* » et examinées sous microscope pour détermination des genres mycéliens.

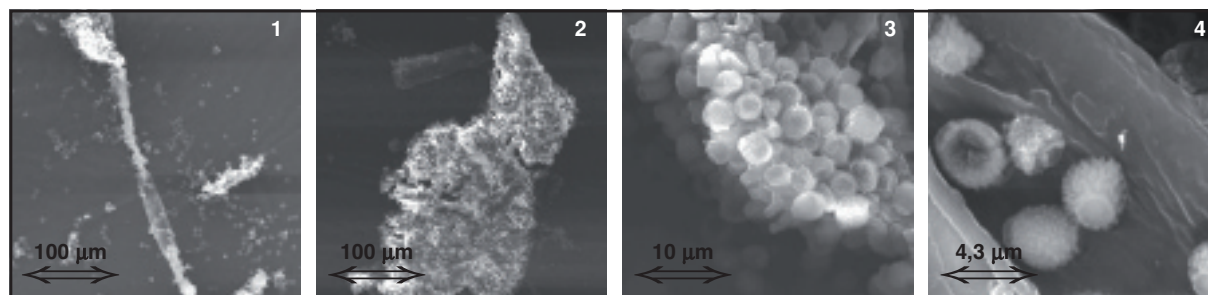
La mise en culture nous a confirmé la présence de moisissures. L'observation au microscope optique des moisissures cultivées a permis de déterminer le genre *Aspergillus* rencontré lors de l'analyse du prélèvement sur les surfaces (Photos 1 à 3) [12]. Toutefois, par simple observation visuelle au préalable des zones contaminées du contreplaqué, nous avons constaté et prélevé deux colorations différentes de la matière organique (une brune et une verdâtre) qui laissent supposer l'existence de deux genres ou deux espèces de moisissures.

L'observation au microscope électronique à balayage des moisissures mises en culture a mis en évidence la présence d'un second genre, le *Penicillium* (Photo 5).

L'observation des prélèvements sur les étagères a mis en évidence la présence de moisissures dont deux genres ont été analysés après mise en culture. Ce résultat est en accord avec Kanaani *et al.* (2008) [13], et confirme la cohabitation de plusieurs genres de moisissures dans cet environnement.

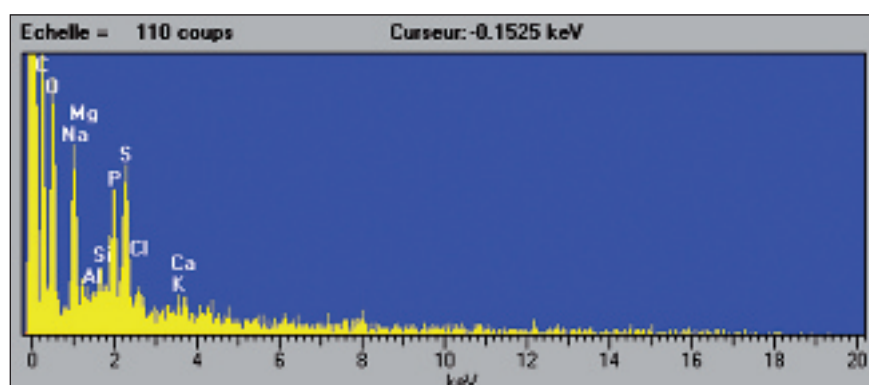
3.2 Mise en évidence de la présence de particules microbiologiques en suspension dans le bâtiment

Afin de récupérer sur filtre les particules en suspension, nous avons utilisé un dispositif de pompe avec des filtres en polycarbonate d'un diamètre



Photos 1, 2, 3 et 4 obtenues avec le microscope électronique à balayage sous différents grossissements : mycélium prélevé sur les surfaces.

Scanning electron microscope photographs of mycelium extracted from the surface of shelves.



Spectre 1.

Analyse par dispersion d'énergie des rayons X (EDXS) d'un groupe de spores.

Analysis of a group of spores by energy dispersive X-ray (EDX).

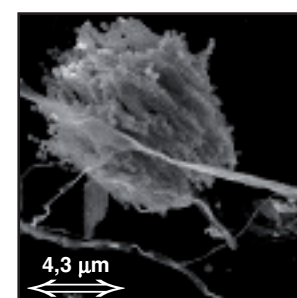


Photo 5 obtenue au microscope électronique à balayage : sporange prélevé sur une boîte de culture.

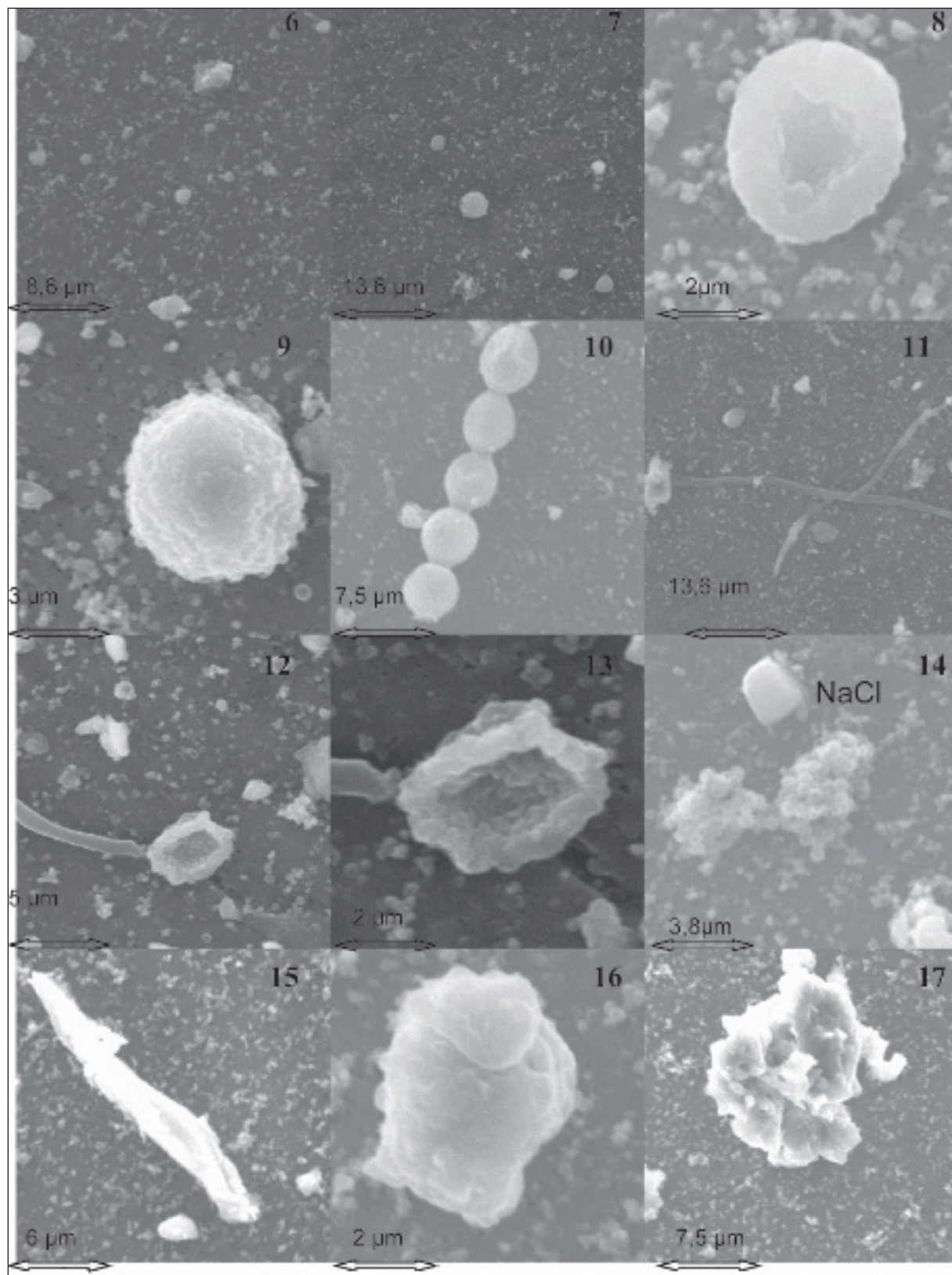
Scanning electron microscope photograph of sporangium taken from a culture dish.

de 47 mm possédant une porosité moyenne de 0,2 µm. Trois échantillons journaliers ont été prélevés entre le 2 et le 5 juin 2009 avec un changement du filtre dans la matinée. Les trois pompages ont été réalisés avec un débit moyen de 10 l/min. Le dispositif de pompage sur filtre a été installé au même emplacement que le compteur de particules et à 1,70 mètre de hauteur. Elle correspond à la hauteur d'inhalation en position debout, position habituelle du personnel manipulant les archives.

Les particules collectées sur les filtres ont été analysées à l'aide du microscope électronique à balayage (MEB). En effet, nous pouvons ainsi vérifier les répartitions en nombre, en taille, et estimer la surface particulaire. La fraction granulométrique pour différentes gammes de tailles a été déterminée par un comptage des particules observées sur les images obtenues au MEB. À titre d'exemple, sur la Photo 6, on comptabilise 134 particules pour la gamme [0,3-1] µm, 5 particules pour la gamme [1-2,5], 2 particules pour la gamme [2,5-5] et aucune particule pour les gammes supérieures à 5 µm. Ainsi, les fractions granulométriques moyennes prélevées sur un filtre pour les gammes de tailles [0,3-1], [1-5] et > 10 µm ont été estimées respectivement à 3 108, 3 106, 3 105 particules.

Les filtres installés dans le bâtiment se sont avérés entièrement couverts de petites particules, montrant que l'environnement était pollué par des suies issues de la combustion des hydrocarbures dans les moteurs (Photos 6 et 7). En effet, sur l'ensemble des photographies (Photos 6 à 17), on note la présence de très nombreuses particules de taille inférieure à 0,7 µm, gamme de taille correspondant aux aérosols issus de la conversion gaz-particules. Cette observation est en accord avec les données granulométriques qui indiquent, pour les gammes [0,3-0,5] et [0,5-1] µm, un pourcentage de particules nettement supérieur à celui des autres gammes.

Nous constatons également la présence de spores dont le diamètre varie entre 1 et 5 µm sur les photos 8 à 10. La photographie 10 représente une chaîne de spores, dont la structure est caractéristique du genre *Penicillium* [12]. Nous avons pu observer sur nos filtres des hyphes (Photos 11 à 13) présentant un amas de spores n'ayant pas atteint leur stade maximal de maturité. Ainsi, les concentrations en particules dans les gammes [1-2,5] et [2,5-5] µm mesurées par le compteur optique au début de l'étude sont liées à la présence de spores de moisissures. Les spores en suspension prélevées sur les filtres sont identiques à celles retrouvées lors de l'observation de la matière



Photos 6 à 17 obtenues au microscope électronique à balayage sous différents grossissements :
particules collectées sur des filtres en polycarbonate.

Scanning electron microscope photographs of airborne particles collected on polycarbonate filters.

organique prélevée directement sur les étagères et aussi à celles observées pour les cultures sur milieu *Bacto Yeast Extract*.

Les particules en suspension collectées sur filtre contiennent, outre les spores de moisissures, des cristaux de sel (Photo 14), des résidus microscopiques de papier (Photo 15), ou encore des particules terrigènes (Photos 16 à 17).

3.3 Concentrations de spores en suspension dans le local

Sur la figure 1, nous avons constaté que dans les gammes [1-2,5[et [2,5-5[μm , les courbes étaient quasi constantes au cours du temps avec des variations relatives faibles entre les périodes de repos et d'activité dans le bâtiment. Bowen *et al.* (2000) ont trouvé que les spores d'*Aspergillus* présentent une adhésion aux surfaces importante en présence d'humidités supérieures à 64 % [14]. Ainsi, on peut supposer que dans le cas étudié, où l'humidité est toujours supérieure ou égale à 80 %, leur remise en suspension est faible. Par conséquent, l'activité humaine dans le local se traduit, dans les deux gammes [1-2,5[et [2,5-5[μm , par la remise en suspension principalement des particules non biologiques. Aussi la faible variation relative des concentrations observée suggère que la libération des spores se fait de manière continue et contrebalance la déposition. Elle suggère aussi que les concentrations en spores libérées sont du même ordre que celles des autres particules remises en suspension par l'activité humaine. Le comportement des courbes pour les gammes [1-2,5[et [2,5-5[μm est directement lié à la sporulation.

4. Conclusion

Cette étude de la pollution intérieure en zone tropicale humide a été menée en utilisant différentes méthodes qui ont donné des résultats consistants. Trois gammes de tailles de particules ont été mises en évidence dans un hangar d'archives lors de l'ana-

lyse granulométrique et leur concentration en nombre a été mesurée. Les plus grosses particules, supérieures à 5 μm voient leur concentration augmenter considérablement lors des heures de travail. Elles sont constituées de particules minérales, de quelques particules biologiques (fragments de mycélium), ainsi que de particules de papier soulevées lors de l'activité humaine dans le hangar d'archives. Les particules de diamètre inférieur à 1 μm sont principalement des suies qui sont liées à la pollution extérieure. Leur concentration est corrélée au trafic automobile. Une dernière gamme de tailles de particules a retenu notre attention, celle entre 1 et 5 μm . Les mesures granulométriques ont montré que les concentrations de ces particules « intermédiaires » variaient peu lors des heures d'activité humaine. Ce comportement est lié à la présence en suspension dans l'air de spores de moisissures (*Penicillium* et *Aspergillus*). La mise en culture des moisissures prélevées sur le contreplaqué a confirmé leurs genres. Dans ce hangar confiné, les conditions environnementales sont favorables à la prolifération des moisissures responsables de la libération des spores. Ces résultats sur la présence d'organismes microbiologiques et de particules de suies en grand nombre peuvent expliquer les plaintes du personnel. Pour ces plus petites particules, une étude sera réalisée par la suite, sur leur composition chimique et l'évaluation de leur surface. Sur le plan technique, nos résultats soulèvent le problème de l'utilisation de contreplaqué en atmosphère chaude et humide. Des études complémentaires s'avèrent nécessaires.

Remerciements

Les auteurs remercient le C3MAG et son responsable Jean-Louis Mansot pour la mise à disposition du microscope électronique à balayage et en particulier son ingénieur Yves Bercion pour toute son aide.

Des remerciements sont faits à la doctorante Nadiège Nomède-Martyr du Laboratoire GTSI pour son aide et son temps précieux mis à disposition.

Références

- [1] Morawska L, Salthammer T, Fundamentals. Indoor Environment: Airborne Particles and Settled Dust. WILEY-VCH, Weinheim 2003 : 3-46, 450 p.
- [2] Gerrity TR. Regional deposition of gases and particles in the lung: Implications for mixtures. *Toxicology* 1995 ; 105 (2-3) : 327-34.
- [3] Gehin E, Ramalho O, Kirchner S. Size distribution and emission rate measurement of fine and ultrafine particle from indoor human activities. *Atmospheric Environment* 2008 ; 42 : 8341-52.
- [4] El Hijri J. Contribution expérimentale et numérique à l'étude de la remise en suspension des particules par l'activité humaine. Thèse. Faculté des Sciences et Techniques (Maroc) et Université de la Rochelle 2008.

- [5] Mangili A, Gendreau MA. Transmission Of Infectious Diseases During Commercial Air Travel. *Lancet* 2005 ; 365 (9463) : 989-96.
- [6] Gao NP, Niu JL. Modeling Particle Dispersion And Deposition In Indoor Environments. *Atmospheric Environment* 2007 ; 41 (18) : 3862-76.
- [7] Pène P, Masse R. Rapport : Air extérieur, air intérieur et santé. Académie Nationale de Médecine, Paris 2009 : 21-22, 59 p.
- [8] Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J. Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 ; 155 : 1376-83.
- [9] Penttinen P, Timonen KL, Tiittanen P, Mäkelä A, Ruuskanen J, Pekkanen J. Number concentration and size of particles in urban air: effects on spirometric lung function in adult asthmatic subjects. *Environmental Health Perspectives* 2001 ; 109 : 319-23.
- [10] Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, Groupe de travail « Moisissures dans l'habitat ». Chap. II : Humidité et environnements intérieurs. Contamination fongique en milieux intérieurs. 2006 : 19-34, 101 p.
- [11] Santucci R, Meunier O, Ott M, Herrmann F, Freyd A, de Blay F. Contamination fongique des habitations : bilan de dix années d'analyses. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 2007 ; 47 (6) : 402-8.
- [12] Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, Groupe de travail « Moisissures dans l'habitat ». Chap. I : Principales moisissures rencontrées dans l'habitat et l'environnement intérieur. Connaissance des espèces impliquées. Contamination fongique en milieux intérieurs. 2006 : 7-18, 101 p.
- [13] Kanaani H, Hargreaves M, Ristovski Z, Morawska L. Deposition rates of fungal spores in indoor environments, factors effecting them and comparison with non-biological aerosols. *Atmospheric Environment* 2008 ; 42 : 7141-54.
- [14] Bowen WR, Lovitt RW, Wright CJ. Direct quantification of *Aspergillus niger* spore adhesion to mica in air using an atomic force microscope. *Colloids and Surfaces* 2000 ; 173 : 205-21.

