

## Détection par CPG de la production de COV par 2 souches marocaines de *Fusarium* et d'*Aspergillus* sur céréales

Hajjaji A.<sup>1\*</sup>, Bouseta A.<sup>1</sup>, Bouya D.<sup>1</sup>, Lebrihi A.<sup>2</sup> & Collin S.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Faculté des Sciences Dhar El Mahraz Fès, Maroc

<sup>2</sup> Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie - INPT, Toulouse, France

<sup>3</sup> Faculté d'Ingénierie Biologique Agronomique et Environnementale, UCL, Belgique

### Résumé

La production et l'émission de composés organiques volatils et de toxines dans l'atmosphère ou dans les denrées alimentaires peuvent s'accompagner de risques environnementaux et sanitaires qui peuvent être parfois graves. Ainsi, la connaissance de la nature des COV produits, des conditions de leur production et des organismes producteurs peut permettre la maîtrise de ces risques et la réduction de la contamination.

Dans le présent travail, la production de COV par des souches de *Fusarium sp.* et d'*Aspergillus sp.* isolées à partir de céréales marocaines et cultivées dans des conditions contrôlées sur des semences de blé a été étudiée. Les composés organiques volatils légers ont été analysés par Headspace dynamique à une température de 60°C alors que les plus lourds ont été analysés par CPG après extraction à l'aide d'un appareil de type Likens-Nickerson. La production a été mesurée sur des cultures âgées de 21 jours.

Les résultats ont montré l'existence de plusieurs composés appartenant à la famille des aldéhydes, des alcools et des hydrocarbures dont le toluène qui est nocif pour la santé et l'environnement.

### Abstract

The Production of the volatile organic compounds and toxins in atmosphere and food product will be associated with serious environmental and health risks. The study of COV produced, the conditions of their production allow to control and reduce the contamination.

In this work, the production of VOC by 2 strains: *Fusarium sp.* and *Aspergillus sp.* isolated from Moroccan cereal grains and cultivated in controlled conditions on wheat has been studied. The light volatile organic compounds were analysed by dynamic headspace at 60°C. Heavy volatiles were analysed by GC after their extraction using Likens-Nickerson apparatus. The production was measured 21 days after inoculation.

The results show the presence in culture of several compounds such aldehydes, alcohols and hydrocarbons as toluene, which is harmful for health and environment.

**Mots Clés :** COV, CPG, Environnement, santé, *Fusarium*, *Aspergillus*

**Key words:** VOC, Fungi, Health, Environment

### Introduction

Les composés organiques volatils microbiens (COVM) sont des métabolites de champignons détectés dans l'air des maisons contaminés, les sites de compost, les déchets des usines ainsi que dans toutes les matières organiques contaminées [1,2]. Ils sont considérés comme un risque potentiel pour la santé humaine, du fait de leurs effets diversifiés tels que la léthargie, le mal de tête, l'irritation des yeux et les muqueuses membranaires du nez et de la gorge [3-4]. Ainsi les voies respiratoires constituent les cibles principales pour les effets des COVM [5,6].

Les études entreprises sur les COV depuis quelques années ont conduit à l'identification d'une centaine de composés appartenant à différentes classes chimiques comme les alcools, les aldéhydes, les cétones, les esters, les éthers et les terpènes [1,2]. Leur production semble

dépendre de plusieurs facteurs tels que le substrat, la température, la teneur en oxygène, l'âge de la culture et les espèces microbiennes. En effet, certaines substances comme les sesquiterpènes pourraient être exploitées non seulement pour l'identification de certaines espèces microbiennes [7] mais serviraient également comme indicateurs de mycotoxines [8,9]. D'autres COV ont été proposés comme moyen de prédiction de l'ochratoxine A (OTA) et du déoxynivalénol (DON). A titre d'exemple, Olsson et al. [10] ont montré que des teneurs élevées en cétones (2-Hexanone, 3-Octanone) indiqueraient une concentration en OTA supérieure à 5µg/kg. Quant à certains hydrocarbures (toluène, pentadécane) et alcools (éthylhexanol, 1-Octanol, 1-Nonanol, 1-

Heptanol), ils seraient corrélés négativement au déoxyrnivalénol. Par ailleurs, des COVM fréquemment détectés dans les sites contaminés serviraient comme indicateurs de croissance des moisissures qui se développent dans les milieux intérieurs [1,2, 11-12].

Wessén et Schoeps [13] ont répertorié un ensemble de 23 composés organiques volatils, qui seraient produits uniquement par des champignons ou bactéries, en deux classes (classe A et classe B) selon leur fréquence. La classe A, dont les composés sont fréquemment détectés dans les milieux intérieurs contaminés, comprend le 2-Hexanone; le 3-Méthyl-1-butanol; le 1-Butanol; le 2-Méthyl-1-propanol; le 3-Octanol; le 2-Octen-1-ol; le diméthyl-disulfure; le 2-Pentanol; la geosmine; le 2-Heptanone; le 3-Méthylfuranne; le 2-Méthyl-2-butanol ; le 3-Octanone et le 1-Octen-3-ol.

D'autres travaux ont été plutôt consacrés à l'étude des effets cytotoxiques [14] ou génotoxiques de certains COV [6]. Ainsi, Kreja et Seidel [14] ont rapporté que certains alcools présenteraient des effets cytotoxiques comme le 1-Décanol suivi du 1-Octen-3-ol et dans une moindre mesure le 3-Méthylbutanol.

Si au niveau international, l'étude de métabolites fongiques (COV et mycotoxines) et leur impact sur la santé, l'environnement et l'économie a reçu beaucoup d'attention ces dernières années, les études publiées sur les contaminations fongiques des denrées marocaines restent très faibles. Ainsi, pour connaître la nature des produits nocifs synthétisés (COV, mycotoxines) par les espèces fongiques marocaines et à plus long terme de mettre en évidence des marqueurs de champignons marocains toxigènes, notre étude vise l'analyse des COV produits par deux souches de *Fusarium sp.* et *Aspergillus sp.* isolées à partir de céréales marocaines.

## Matériels et méthodes

### Milieux et conditions de culture

Les deux souches (*Aspergillus sp.* et *Fusarium sp.*) qui ont servi pour l'étude des COVM ont été isolées à partir des graines de céréales marocaines provenant de la région de Béni Mellal. Après incubation sur milieu Czapek agar à 25 °C (10 jours pour *Aspergillus* et 15 jours pour le *Fusarium*), les spores sont récoltées dans 2 ml d'eau distillée stérile puis comptées. Dans des Erlens de 250 ml, 50g de grains de blé humidifiés à 50 % et stérilisés deux fois, sont inoculés avec une suspension de 1000 spores/g. Après 21 jours d'incubation à 25°C, les erlens sont séchés à 50°C pendant 48h et la culture est broyée à l'aide d'un Moulinex puis stockée à -18°C jusqu'à son utilisation.

### Analyse des composés volatils légers par headspace dynamique

#### Conditions opératoires de l'injecteur "Purge and Trap"

Les composés organiques volatils émis par les moisissures sont concentrés à l'aide d'un injecteur type "Purge and Trap" et analysés par chromatographie en phase gazeuse.

Dans la vaisselle de purge, 9 ml d'eau ultrapure et 25µl d'une solution de 11.1 ppm de 2-Méthylpentanal (standard interne) sont ajoutés à 1 g de milieu de culture finement broyé.

Les COV de la culture de céréales sont purgés par de l'azote (20 ml/min) pendant 15 min à une température de 60°C. La vapeur d'eau est arrêtée par un condenseur maintenu à -16°C à l'aide d'un cryostat. La plupart des COV sont entraînés par l'azote et traversent un four à 200°C, puis sont piégés dans une trappe refroidie à -95°C par l'azote liquide. Après la purge, la trappe est rapidement chauffée jusqu'à 220°C et maintenue à cette température pendant 5 min. Les composés sont alors injectés dans la colonne où ils seront séparés et décelés grâce à un détecteur à ionisation de flamme.

### Analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Le chromatographe (Hewlett Packard 5890) est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme, d'un injecteur "Purge and Trap" (Chrompack) et d'un intégrateur (Shimadzu CR3A). la séparation des composés est réalisée sur une colonne apolaire (50mx0.32 mm WCOT CP SIL 5 CB, épaisseur du fil 1.2 µm). La température du four est maintenue à 36°C pendant 15 min et programmée ensuite de 36 à 100°C avec une pente de 2°C/min. Le four est maintenu à 100°C pendant 30 min. Le débit du gaz vecteur (azote) est de 1.5 ml/min, les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement 200 et 220°C. La surface minimale des pics est fixée à 500 µV.S.

### Analyse des composés organiques volatils "lourds"

#### Extraction des composés organiques volatils

Les composés organiques contenus dans 5 g de culture de céréales finement broyées sont extraits par 3x 20 ml de dichlorométhane dans un Ultra Turrax pendant 3 min. La phase organique est rassemblée et concentrée à un volume final de 1 ml à l'aide d'un Kuderna. Pour séparer les substances non volatiles des COV, une extraction-distillation simultanée de la phase organique concentrée a été réalisée à l'aide d'un appareil Likens-Nickerson selon la méthode décrite par Bouseta et Collin [15]. L'extrait obtenu auquel sont ajoutés 10µl d'une solution de 956 ppm de chloroheptane (standard externe : EST) est concentré à nouveau jusqu'à un volume de 0,5 ml.

### Analyse des COV par chromatographie en phase gazeuse et repérage olfactif

Le chromatographe (Thermo Finnigan, Trace 2000) est équipé d'un injecteur split-splitless, d'un détecteur à ionisation de flamme, d'un détecteur olfactif et d'un intégrateur (Spectra-Physics, Chromjet DP700). La séparation est réalisée sur une colonne capillaire (50mx0.32 mm WCOT CP SIL 5 CB, épaisseur du fil 1.2 µm). La température du four est maintenue à 36°C pendant 2 min et programmée ensuite de 36°C à 85°C avec une pente de 20°C/min, puis jusque 145°C à 1°C/min et enfin jusque 250°C à 3°C/min. le four est

maintenu à 250°C pendant 30 min. Le débit du gaz vecteur (azote) est de 1 ml/min. La température de l'injecteur est de 225°C et celle du détecteur est de 275°C. La surface minimale des pics est fixée à 1000  $\mu$ V.S.

2 $\mu$ l de l'extrait sont injectés et en sortie de colonne, un diviseur permet d'envoyer la moitié de l'effluent vers le détecteur FID et l'autre moitié vers une sortie chauffée munie d'un entonnoir où sera placé le nez de l'opérateur. Chaque composé séparé est flairé et l'intensité et le qualificatif de l'odeur perçue seront notés.

#### Résultats et discussions

L'analyse des composés volatils légers a été réalisée par headspace dynamique en utilisant un injecteur "Purge and Trap" qui permet de concentrer les COV avant de les injecter. Cette étude a montré que les deux souches peuvent émettre des substances volatiles. La figure 1

montre que l'isolat de *Fusarium* produit 3 aldéhydes, identifiés sur base des temps de rétention, l'isobutanal, le 3-Méthylbutanal et le 2-Méthylbutanal alors que l'isolat d'*Aspergillus* ne produit que très peu de 3-Méthylbutanal. Ces 3 aldéhydes sont souvent produits dans les denrées alimentaires via la dégradation de strecker à partir des acides aminés correspondants. L'absence de ces composés dans le blé témoin, montre qu'ils seraient produits, probablement par voie biochimique (Voie anabolique de Genevoix, voie catabolique d'Ehrlich). Le manque de données dans la littérature concernant ces aldéhydes comme métabolites fongiques est dû probablement à leur volatilité et la limite de détection des méthodes d'analyse.

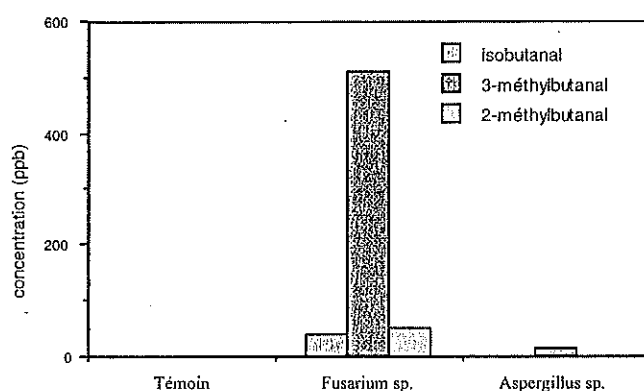


Figure 1: teneurs en aldéhydes : isobutanal, 3-Méthylbutanal et 2-Méthylbutanal chez les 2 isolats marocains et dans le blé témoin après 21 jours d'incubation.

Les composés organiques volatils "lourds" produits par les deux souches marocaines ont été extraits par le dichlorométhane et séparés des substances non volatiles par une distillation-extraction simultanée à l'aide d'un appareil type Likens-Nickerson. Les extraits obtenus sont représentatifs du milieu de culture du point de vue odeur. L'examen de la figure 2 indiquant les chromatogrammes obtenus par GC/FID des extraits du blé témoin et des deux isolats étudiés (*Fusarium sp.* et *Aspergillus sp.*) a montré d'une part qu'un ensemble de COV est produit par les deux souches et d'autre part que leur profil chromatographique est différent surtout pour les temps de rétention supérieurs à 70 minutes.

Pour identifier les composés détectés et déterminer les substances odorantes caractérisées par la note "moisi" ou "odeur de souche" et qui pourraient être

exploitées pour une détection rapide de ces souches, nous avons réalisé une analyse olfactométrique "sniffing" sur l'extrait en parallèle avec l'analyse GC/FID. Trois opérateurs ont participé à ce flairage en sorti de colonne et seules les odeurs détectées et caractérisées de manière univoque ont été retenues. Sur base d'une comparaison des temps de rétention et des odeurs perçues par les 3 opérateurs à la fois des composés détectés et ceux des standards, une série de composés a pu être identifiée.

Le Tableau I montre que ces métabolites microbiens appartiennent à la famille des aldéhydes, alcools, esters et hydrocarbures. L'odeur de "moisi" a été notée pour le 1-Hepten-3-ol présent à une teneur 2 fois plus élevée chez le *Fusarium*. Cet alcool ne semble pas être produit par plusieurs souches citées dans la littérature.

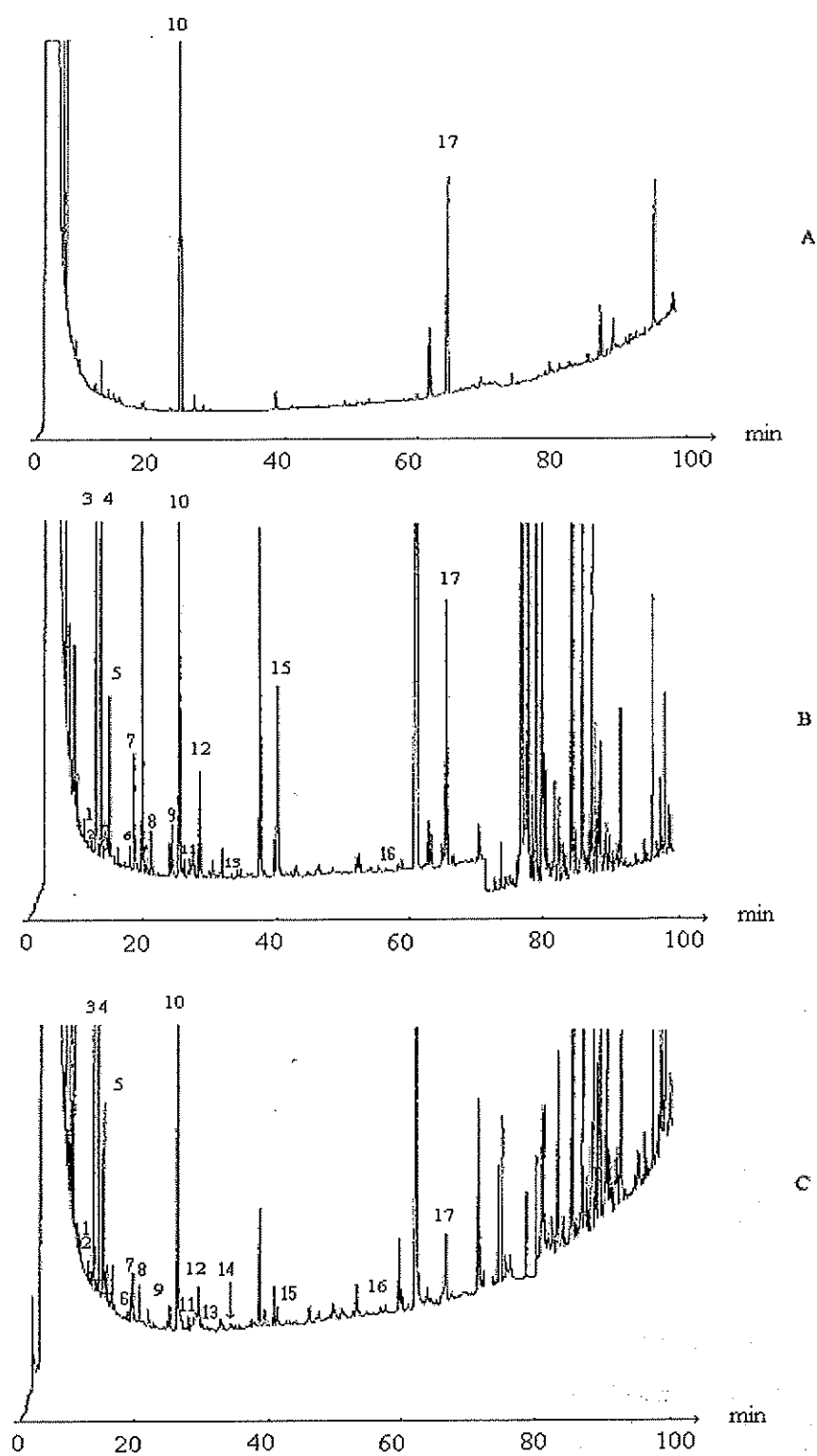


Figure 2. (A): chromatogramme de l'extrait de blé témoin, (B): chromatogramme de l'extrait de culture de *Fusarium* sp., (C): chromatogramme de l'extrait de culture d'*Aspergillus* sp.

**Tableau I : Composés organiques volatils produits par des souches marocaines *Fusarium sp.* et *Aspergillus sp.***

Composés	NP	TR (min)	Odeur	<i>Fusarium sp.</i> (ppm)	<i>Aspergillus sp.</i> (ppm)
3-Méthylbutanol	1	11.8	Amande amère, vernis	1.23	1.05
2-Méthylbutanol	2	11.9	Vernis	0.86	0.45
Toluène	3	13.6	Gaz, colle	4.90	0.90
Hexanal	4	14.5	Verdure	0.71	0.71
Octane	5	15.5	-	0.47	0.50
1-Hexanol	6	18.5	Verdure, gazon coupé	0.73	0.76
1-Hepten-3-ol	7	19.4	Moisi, terre humide	0.65	0.32
2-Heptanone	8	20.8	Désagréable, gras, sueur	0.80	0.78
$\alpha$ -Pinène	9	25.5	Odeur mentholée	0.84	0.75
Chloroheptone (EST)	10	26.1	Champignon	EST	EST
1-Octène-3-ol	11	27.6	Zeste citron	0.46	0.43
Heptanol	12	29.4	Florale	1.18	0.76
Phénylacétaldéhyde	13	32.8	Zeste d'orange	2.18	2.11
Limonène	14	34	Floral- fruité	-	0.55
2-Phényléthanol	15	41.1	Floral, rose fanée.	1.58	0.67
Phényléthylacétate	16	58.4	Huile de paraffine, huile de	0.57	0.58
t 2, t 4 -Décadiénal	17	66.2	friture, huile brûlée	2.04	0.77

TR : Temps de rétention, PN : numéro de pic, EST : Standard externe, - : non détecté

Parmi les composés identifiés, seul le t 2, t 4 -Décadiénal est détecté dans le témoin (1,27 ppm)

Deux monoterpènes ont été identifiés : le  $\alpha$ -Pinène dont la teneur est de l'ordre de 0,8 ppm chez les deux souches alors que le limonène n'est détecté que chez *Aspergillus*. Pasanen et al. [16] ont rapporté que la biosynthèse des COVM dépendrait de l'espèce/genre et du substrat. D'après cette étude la production de monoterpènes semble être liée à la biosynthèse des trichothecenes, le limonène (> 20% du total des COV) est surtout produit par *Fusarium* toxigène sur blé alors que sur l'avoine c'est plutôt le  $\alpha$ -Pinène qui prédomine.

Parmi les 23 COVM répertoriés par Wessén et Schoeps [13], 3 ont été identifiés : le 3-Méthylbutanol, le 2-Heptanone et le 1-Octen-3-ol. Notons que ces trois composés sont souvent identifiés dans les milieux intérieurs contaminés. En effet Miller et al. [17] ont montré que le 3-Méthylbutanol et le 2-Heptanone ont été détectés dans 44% et 89% des maisons contaminées respectivement. Quant au 1-Octen-3-ol, il serait produit par plusieurs souches. De plus, Kreja et Seidel [14] ont montré que le 1-Octen-3-ol serait plus cytotoxique que le 3-Méthylbutanol. Des phénomènes de synergie pourraient aggraver le risque sanitaire et environnemental vu que les 2 souches étudiées produisent les 2 alcools simultanément. En effet, Korpi et al [18] ont rapporté que les différences notées pour les effets d'irritation pour un COV ou un mélange de COV seraient dues aux phénomènes de synergie.

Le toluène, hydrocarbure aromatique nocif pour la santé et pour l'environnement, a également été détecté dans les cultures et dont les teneurs sont de l'ordre de 4,9 ppm pour le *Fusarium* et 0,9 ppm pour *Aspergillus*. Nos résultats sont en accord avec les

travaux de Olsson et al. [10] qui ont montré que le toluène serait corrélé négativement au déoxynivalénole (mycotoxine produite principalement par certaines espèces de *Fusarium*). L'analyse de cette toxine par HPLC-UV a montré que la souche de *Fusarium*, dans les conditions précisées dans matériels et méthodes, ne produirait pas de DON (ou teneur < 0,5 ppm). Le t2, t4-Décadiénal, identifié dans l'extrait du témoin et ceux des deux souches, serait issu de la dégradation chimique des lipides.

Des composés comme le phénylacétaldéhyde, le 2-Phényléthanol et le phényléthylacétate, ayant une note florale seraient identifiés pour la première fois dans les cultures de moisissures.

L'identification des composés ayant des temps de rétention supérieurs à 70 min serait nécessaire étant donné que les profils chromatographiques des deux souches et les odeurs perçues même pour des temps de rétention identiques sont différentes.

#### Conclusion

Notre étude montre que les deux souches (*Fusarium sp.* et *Aspergillus sp.*) isolées à partir des céréales marocaines sont capables de synthétiser des COV odorants comme le toluène, le 3-Méthylbutanol, le 1-Octen-3-ol et le 2-Heptanone qui présenteraient un réel risque sanitaire et environnemental. L'étude Approfondie de la production des COVM ainsi que la maîtrise des paramètres qui influencent cette biosynthèse permettront de mieux cerner les problèmes de contamination fongiques aussi bien dans les denrées alimentaires marocaines que dans les

milieux intérieurs et de mettre ainsi en évidence des moyens rapides de détection et de prévention

#### Remerciements

Ce travail a été réalisé avec le soutien du Comité Mixte Inter Universitaire Maroco-Français, **Action intégrée n° MA/03/81** et le soutien du Conseil Inter Universitaire de la Communauté Française de Belgique " CIUF " (Projet CUD : PIP 2001- 2005).

#### Bibliographie

- Dewey S., Sagunski H., Palmgren U., Wildeboer B., (1985) Microbial volatile organic compounds: a new approach in assessing health risk by indoor mould?. *Zbl. Hyg*; **197**, 504-515.
- Fischer G., Schwalbe R., Ostrowski R., Dott W., (1998) Airborne fungi and their secondary metabolites in working places compost facility. *Mycoses*; **41**, 383-388.
- Kjaergaard S., Mølhav L., Pedersen O. F., (1991) Human reactions to a mixture of indoor air volatile organic compounds. *Atmos. Environ*; **25**, 1417-1426.
- Mølhav L., Liu Z., Jørgensen A. H., Pedersen O. F., Kjaergaard S., (1993) Sensory and physiological effects on humans of combined exposures to air temperatures and volatile organic compounds. *Indoor Air*; **3**, 155-169.
- Flannigan B., Miller J.D., (1994) *Health implications of fungi in indoor environments-an overview*. In Samson R., Flannigan B., Flannigan M., Graveso S. editors, *Health implications of fungi in indoor environments*, Elsevier, New York, p 3-28.
- Seidel H.J., Plappert U., (1999) On the toxicology of two detected MVOCs: 1-octen-3-ol and 3-methyl-1-butanol, *Umweltmed Forsch. Prax*; **4**, 251-312.
- Nilsson T., Larsen T.O., Montanarella L. Madsen J.Ø., (1996) Application of head-space solide microextraction for the analysis of volatile metabolites emitted by *Penicillium* species. *J. Microbiol. Methods*; **25**, 245-255.
- Jelen H., Mirocha C.J., Wasowicz E., Kaminski E., (1995) Production of volatile sesquiterpenes by *Fusarium sambucinum* strains with different abilities to synthesize trichothecenes. *Appl. Environ. Microbiol*; **3815-3820**.
- Jelen H., Latus-Zietkiewicz D., Wasowicz E., Kaminski E. (1997) Trichodiene as a volatile marker for trichothecens biosynthesis. *J. Microbiol. Methods*; **31**, 45- 49.
- Olsson J., Börjesson T., Lundstedt T., Schnürer J., (2002) Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose. *Int. J. Food. Microbiol*; **72**; 203-214.
- Böck R., Schleibinger H., Rüden H., (1998) Volatile secondary-metabolites as indicators for fungal growth indoors. *Umweltmed. Forsch. Prax*; **3**, 359-364.
- Sagunski H., (1997) Microbial volatile organic compounds as markers of exposure to indoor mould?. *Umweltmed. Forsch. Prax*; **2**, 95-100.
- Wessén B., Schoeps K.-O., (1996) Microbial volatile organic compounds what substances can be found in sick buildings?. *Analyst*; **131**, 1203-1205.
- Kreja L., Seidel H-J., (2002) On the cytotoxicity of some microbial volatile organic compounds as studied in the human lung cell line A549. *Chemosphere*; **49**, 105- 110.
- Bouseta A., Collin S., (1995) Optimized likens-Nickerson methodology for quantifying honey flavours. *J.Agric. Food. Chem*; **43**, 1890 - 1897.
- Pasanen A-L., Lappalainen S., Asanen P., (1996) Volatile organic metabolites associated with some toxic fungi and their mycotoxins. *Analyst*; **121**, 1949- 1953.
- Miller J.D., Laflamme A.M., Sobol Y., Lafontaine P. Greenhalgh R., (1988) Fungi and fungal products in some canadien houses. *Int. Biodetection*; **24**, 103- 120.
- Korpi A., Pasanen J.P., Alarie Y., Kosma V.M., Pasanen A.L., (1999) Sensory irritating potency of some microbial volatile organic compounds (MVOCs) and a mixture of five MVOCs. *Arch. Environ. Health*; **54**, 347- 352.