

Isolement et Identification de souches de moisissures réputées toxigènes

TAHANI N., ELAMRANI A. SERGHINI-CAID H., OUZOULINE M. & KHALID A.

Laboratoire de Biologie des Plantes et des Microorganismes, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université Mohamed Premier, Bd Med VI, BP 717 60.000 Oujda Maroc. E mail: nawfel.tahani@menara.ma. GSM: 070700583

Résumé

La présence de flore fongique dans les céréales destinées à l'alimentation de l'Homme peut engendrer de graves conséquences sur sa santé. Le développement de cette flore compte parmi les principales causes d'altération sanitaire des céréales. Le contrôle de la qualité du grain de blé en post récolte, lors d'entreposage et jusqu'au broyage permet de limiter les pertes du produit causées par ces moisissures. C'est un moyen de prévention et de gestion des risques de contaminations par les champignons dont certains peuvent être fortement toxigènes. L'étude de l'évolution de la contamination fongique d'échantillons de blé tendre, refusés pour écrasement en farine (au niveau des moulins ACHARK) et stocké à température ambiante, montre que le taux de contamination de certains échantillons de blé analysés est très élevé. Ainsi, au bout de 9 mois de stockage, la contamination peut atteindre 95% des grains. Le genre *Aspergillus* représenté avec des espèces différentes a été retrouvé dans les cinq échantillons analysés avec une fréquence et une abondance allant de 31 à plus de 60% des grains contaminés. Les genres *Penicillium* et *Alternaria* peu fréquent sont respectivement présents avec des pourcentages ne dépassant guère les 22% et 15% de grains contaminés. Enfin, Les genres *Geotrichum* et *Rhizopus* sont les moins fréquents et les moins

abondants dans les échantillons de blé tendre analysés. Parmi ces moisissures au moins trois genres sont potentiellement toxigènes.

Mots clés: Blé tendre, stockage, moisissures, *Aspergillus*, *Penicillium*

Introduction

L'altération des céréales durant le stockage a été largement étudiée dans la littérature (Karunakaran et al. 2001, Atalla et al. 2003 ; Zia-Ur-Rehman, 2006). La contamination fongique compte parmi les principales causes de détérioration des grains de céréales. Lors de la contamination du blé ; les Paramètres régulant la croissance fongique et qui permettraient la production de toxines sont nombreux. On cite principalement la charge initiale en microflore, la présence de grains brisés, le taux d'humidité et la température de stockage des grains (Zia-Ur-Rahman, 2006). Il a été reporté qu'au cours du stockage et même sans contamination du blé, l'augmentation de la température et/ou de l'humidité, peuvent entraîner des pertes en qualité, en affectant la dureté et la vitrosité du grain, ainsi que son acidité et la qualité de ses protéines (Zia-Ur-Rahman, 2006). Ceci se traduit par des variations dans les paramètres technologiques du grain et peut engendrer des pertes considérables. La nécessité de contrôles qualitatifs du blé avant, pendant et après stockage s'impose. Ainsi l'identification de la flore contaminante potentielle de blé tendre sous les conditions de stockage au Maroc Oriental est d'une grande importance.

L'objectif de ce travail consiste en :

-L'isolement et l'identification des souches de moisissures qui peuvent contaminer naturellement des échantillons de blé tendre stockés pour différentes durées. Un intérêt particulier porte sur les moisissures réputées toxigènes (Weidenböner et al., 2000), puisque ces dernières commencent à croître au delà de 15% d'humidité.

-L'étude de l'évolution de la contamination en fonction du temps. Des essais d'extraction, de purification et de dosage des mycotoxines, potentiellement présentes au niveau de certains échantillons fortement contaminés, sont également en cours.

Matériels et méthodes

1. Matériel biologique

Les analyses ont portés sur des échantillons de blé tendre dont certains ont fait l'objet de refus d'achat pour écrasement au niveau d'une minoterie du Maroc oriental (moulin ACHARK). Les échantillons de blé sains (B1, B2, Bn., Bi) et de blé refusé (Bc) ont été stockés soit à température ambiante, dans le sous sol ou dans la chambre froide pour une période de six à plus de neuf mois. Le suivi de l'évaluation de la contamination a été réalisé en parallèle à l'évolution du taux d'humidité au niveau du grain.

2. Taux d'humidité

Les mesures de l'humidité des échantillons ont été effectuées selon la méthode proposée par la norme marocaine Sur une prise d'essai de 30g broyé, 8g sont pesés et mis dans une étuve réglée à 130°C pendant 4 heures. Après étuvage, la prise d'essai est refroidie dans un dessiccateur pendant 30 min et pesée au mg près. L'humidité (H%) est calculée par différence relative des masses de prise d'essai avant et après séchage à l'étuve.

3. Isolats fongiques

L'isolement des moisissures a été réalisé en déposant 60 grains de blé, prises au hasard de chaque échantillon, dans 4 boîtes de Pétri stériles contenant du papier filtre stérile, imbibé avec 5,5ml d'une solution aqueuse de chlorure de sodium à 7.5% stérilisée au préalable (Mills et al., 1978). Les boîtes ainsi préparées sont incubées à

25°C à l'obscurité pendant 10 à 15 jours. Après ce délai, les grains présentant un développement de moisissures sont repiqués séparément dans des boîtes de Pétri contenant des milieux de culture stériles. Différents milieux de culture (Sabouraud, Malt Extract Agar (MEA), Potato Dextrose Agar (PDA)) ont été utilisés (Moreau, 1991 ; Samson *et al.*, 2000 ; Leontopoulos *et al.*, 2002 ; Lund *et al.*, 2002). Après 5 à 7 jours d'incubation à l'obscurité et à 25°C, les colonies visibles sont identifiées d'après Chabasse et Bouchara (1979), Champion (1997) et Bourée (2001). Pour chaque échantillon l'analyse a été réalisée en trois répétitions.

Résultats

Au terme de l'analyse mycologique, six genres différents ont pu être isolés et identifiés à partir des échantillons de blé tendre analysés. Ainsi, le genre *Aspergillus* est représenté par cinq espèces différentes, le genre représenté *Alternaria* par trois espèces, le genre *Penicillium* représenté par trois isolats différents. Enfin, les genres *Geotrichum* et *Rhizopus* sont représentés par un isolat chacun. La planche 1 montre quelques photos des moisissures isolées de ces échantillons, observés au microscope optique au grossissement X40.

1 Essai sur blé de mauvaise qualité commerciale.

L'échantillon de Blé (Bc), refusé à l'achat pour écrasement au niveau moulin Achark, à cause d'un doute de contamination et la présence de grains brisés, est stocké au laboratoire à température ambiante en vue de suivre l'évolution de sa contamination et la compétitivité entre souches contaminantes. Il montre une évolution rapide de sa contamination accompagnée d'une humidification des grains. Au bout de six mois de stockage, son taux d'humidité est de l'ordre de 40% et plus de 90% de grains de blé sont contaminés (figure 1).

Cet essai de compétitivité, montre que le genre *Aspergillus* (avec quatre espèces *A.niger*, *A.flavus*, *A.fumigatus* et *A. nidulans*) isolé sur 62% des grains contaminées est le principal contaminant ; les genres *Penicillium* et *Alternaria* sont présents respectivement sur 13 et 15% de grains contaminés, enfin le taux de contamination par le genre *Rhizopus* ne dépasse guère les 5% (figure 2).

Planche 1 : Préparations microscopiques des moisissures isolées des échantillons de blé tendre analysés observées au grossissement 40 : (a) *Aspergillus niger*, (b) *Aspergillus flavus*, (c) *Aspergillus fumigatus*, (d) *Aspergillus nidulans*, (e) *Penicillium sp*, (f) *Alternaria brassica*

Figure 1 : Taux d’humidité et de contamination par les moisissures des échantillons de blé tendre analysés. [(Bc): Blé tendre refusé a l’achat au niveau de la minoterie ACHARK stocké pendant six mois, (B1): Blé tendre de la récolte 2005 stocké à température ambiante pendant plus de 9 mois, (B2): Blé tendre de la récolte 2005 stocké à température ambiante dans un sous-sol pendant plus de 9 mois, (Bn): Blé tendre nationale de la récolte 2006 conservé en chambre froide, (Bi): Blé tendre d’importation conservé en chambre froide].

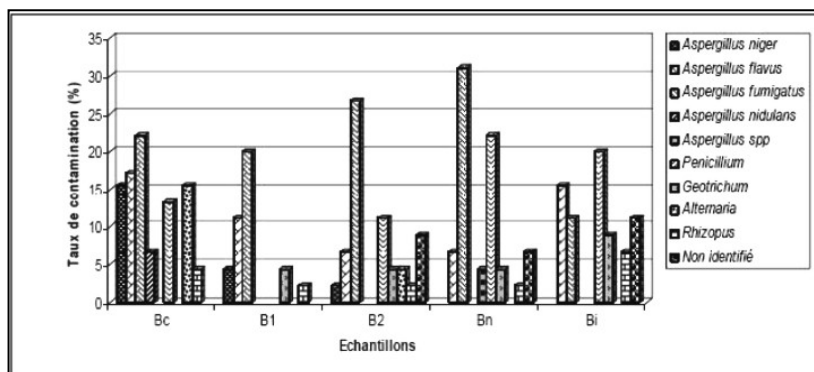


Figure 2 : Pourcentage des grains contaminés par diverses moisissures (voir légende en haut à droite de la figure) isolées des cinq échantillons de blé tendre analysés. [(Bc): Blé tendre refusé a l’achat au niveau de la minoterie ACHARK stocké pendant six mois, (B1): Blé tendre de la récolte 2005 stocké à température ambiante pendant plus de 9 mois, (B2): Blé tendre de la récolte 2005 stocké à température ambiante dans un sous-sol pendant plus de 9 mois, (Bn): Blé tendre nationale de la récolte 2006 en chambre froide, (Bi): Blé tendre d’importation et en chambre froide].

2 Essais sur blé tendre sain.

Les analyses ont porté sur quatre échantillons : B1, B2: Blé marocain de la récolte 2005, Bn: Blé marocain récolte 2006 et Bi: blé d'importation récolte 2006). Le pourcentage de contamination des échantillons de blé B1 et B2, stockés à température ambiante pendant plus de 9 mois est de 42,2% et 66,7% respectivement. Ceci est certainement dû à une forte charge initiale en spores au niveau des grains de blé. Trois genres de moisissures ont été isolés et identifiés à partir de l'échantillon B1 par contre à partir de l'échantillon B2 ; six genres sont présents (figure 2). Le genre *Aspergillus* est toujours dominant dans les deux échantillons B1 et B2 avec trois espèces (*A. niger*, *A. flavus* et *A. fumigatus*) et contamine 30 à 35% des grains.

Le genre *Penicillium* est absent de l'échantillon B1, mais présent avec deux isolats dans l'échantillon B2 avec un taux de contamination de 11% des grains. Enfin sur les deux échantillons de blé B1, B2, les genres *Geotrichum* et *Rhizopus*, sont très peu présents avec respectivement 4% et 2% de grains contaminés. Le genre *Alternaria* isolé uniquement de l'échantillon B2 est peu fréquent.

Pour les échantillons de blé de la récolte 2006, conservés en chambre froide, l'étude porte sur l'évaluation de «la charge potentielle en spores du grain». La comparaison entre le blé de production national (Bn) et celui d'importation (Bi), montre des charges potentielles comparables. Sur milieu de culture en boîte de pétri, ceci se traduit par des taux de contamination des grains de l'ordre de 77.à 80%. Cinq genres de moisissures ont été identifiés à partir du blé Bn et seulement trois pour le blé Bi (figure 2). Pour l'échantillon blé Bn, c'est le genre *Aspergillus* (avec trois espèces) qui est le plus fréquent, avec un taux de contamination dépassant les 44% de grains contaminés, le genre *Penicillium* est présent avec un taux de 22% des grains contaminés. Ce dernier est plus fréquent que les *Aspergillus* dans le blé d'importation (Bi) avec respectivement 31 et 20% de grains contaminés.

Discussion et conclusion

Les résultats de l'analyse mycologique ont montré une nette dominance du genre *Aspergillus*. Cette dominance semble être favorisée par une humidité élevée du grain et un stockage de longue période (Figure 2). La dominance du genre *Aspergillus* dans la flore contaminante des céréales a été reportée dans plusieurs travaux (Pitt et Christian 1968 ; Pitt et Miscamble 1995 ; Riba et al., 2005). Ainsi, les espèces du genre *Aspergillus* sont considérés comme des moisissures de stockage (Christensen et al., 1977), *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus fréquente suivie de *A. flavus* et *A. niger*.

Le taux de contamination par le genre *Penicillium* s'est révélé inversement proportionnel à la durée de stockage. Cependant, comme l'ont reporté Pitt et Miscamble (1995), la forte humidité défavorise la croissance des *Penicillium* en faveur de celle des *Aspergillus* qui les dominent. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Weidenbörner et al. (2000) qui ont travaillé sur la mycologie de la farine entière de blé. Les autres souches isolées des échantillons analysés appartiennent aux genres *Rhizopus*, *Alternaria* et *Geotrichum* qui sont naturellement présents sur les cultures au niveau des champs et dans le sol (Christensen et al., 1977). La forte fréquence du genre *Alternaria* dans l'échantillon (Bc) semble être due à l'humidité élevée de cet échantillon.

D'un point de vue mycotoxycologique, trois parmi les six genres isolés sont potentiellement toxigènes (Weidenbörner et al., 2000). Les souches appartenant à ces genres peuvent synthétiser différentes mycotoxines : des Aflatoxines pouvant être produites par les *Aspergillus*, *Penicillium* et *Alternaria*, l'Ochratoxine A. produite surtout par *Penicillium* sur céréales entreposées (Jorgensen K. et al. 1996; Hajjaji A. et al., 2005) la citrinine et autres toxines moins connues produites par *Alternaria* et *Aspergillus* (Weidenbörner et al. 2000). Cette étude a montré que la contamination fongique d'un lot donné est fortement influencée par l'état sanitaire initial du grain

récolté et surtout par son taux d'humidité. La présence de grains brisés ne peut que favoriser le développement de foyer de contamination et par conséquent elle ne peut être que en défaveur d'un stockage de longue durée. Bien que la région du Maroc oriental est caractérisée par son climat sec, la présence de moisissures potentiellement toxigènes montre qu'on n'est pas à l'abri des conséquences que peuvent causer les mycotoxines. La démarche qualité pour un contrôle sanitaire du grain depuis sa récolte, lors du stockage au niveau des silos et jusqu'à sa transformation en farine serait le meilleur moyen de prévention et de gestion du risque au niveau de la filière blé tendre.

Références.

- ATALLA M.M., MOHAMED, HASSANEIN N, ATEF ELBEIH A. ET YOYSSEF ABDELGHANY YOUSSEF Y.A. 2003.** *Mycotoxin production in wheat grains by different Aspergilli in relation to different relative humidity and storage periods. Nahrung/Food* vol. 47, issue 1, p.6-10.
- BOUREE P. 2001.** *Aide mémoire de parasitologie et de pathologie tropicale.* 3^e ed Medecine-sciences. Diagnostic biologique, Chap. 178, 351-357.
- CHABASSE D. ET BOUCHARA J.P. 1997.** *Dermatophytes et moisissures d'intérêt médical.* Laboratoire de parasitologie et de mycologie. Journée biomérieux, 65-72
- CHAMPION R. 1997.** *Identifier les champignons transmis par les semences.* Techniques et pratiques, INRA Edition.
- CHRISTENSEN C.M., MIROCHA C.J. ET MERONUCK R.A. 1977.** *Molds, Mycotoxins and Mycotoxicoses.* Agricultural Experiment Station Miscellaneous Report 142. University of Minnesota, St. Paul, MN. *In* : Withlow L.W. et Hagler W.M., 2001. Mycotoxin contamination of feedstuffs-An additional stress factor for dairy cattle. North Carolina State University, Raleigh, NC. Symposium sur les bovins laitiers. CRAAQ Quebec.

- HAJJAJI A., BOUYA D., BOUSETA A., MATHIEU F., COLLIN S., LEBRIHI A. 2005.** *Occurrence de mycotoxines (Ochratoxine A, Déoxinivalénol) et champignons toxinogènes dans des céréales marocaines.* Impact des facteurs écologiques sur la croissance et la production d'OTA. Symposium Euro-Maghrébin sur les contaminants biologiques, chimiques et la sécurité alimentaire, Fés, Maroc.
- JORGENSEN K., RASMUSSEN G. AND THORUP I. 1996.** *Orchatoxin A in Danish cereals 1986-1992 and daily intake by the Danish population.* *Food Additives and contaminants* 13S 15-16
- KARUNAKARAN C., MUIR W.E., JAYAS D.S., WHITE N.D.G., ABRAMSON D. 2001.** *Safe storage time of high moisture wheat.* *Journal of Stored Products Research.* 37, 303-312.
- LACA A., MOUSIA Z., DIAZ M., WEBB C., PANDIELLA S.S. 2006.** *Distribution of microbial contamination within cereal grains.* *Journal of Food Engineering* 72 332-338
- LEONTOPOULOS D., SIAFAKA A. ET MARKAKI P. 2002.** *Black olives as substrate for Aspergillus parasiticus growth and aflatoxin B1 production.* *Food Microbiol.* 20, 119-126.
- LUND F., NIELSEN A.B. ET SKOUBOE P. 2002.** *Distribution of Penicillium commune isolates in cheese dairies mapped using secondary metabolite profiles, morphotypes, RAPD and AFLP fingerprinting.* *Food Microbiol.* 20, 725-734.
- MILLS J.T., SINHA R.N., WALLACE H.A.H. 1978.** *Multivariate evaluation and isolation techniques for fungi associated with stored rapeseed.* *Phytopathology* 68, 1580-1525.
- MOREAU C. 1991.** *Les moisissures.* Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaire. Contrôle microbiologique. Chap 6, 222-241.

PITT J.I. ET MISCAMBLE B.F. 1995. *Water relations of Aspergillus flavus and closely related species. Journal of Food Protection, 58, 86-90.*

PITT J.I., CHRISTIAN J.H.B. 1968. *Water relations of xerophilic fungi isolated from prunes. Appl. Microbiol. 16, 1853-1858.*

PNM 08.1.210 *Projet de Norme Marocaine. Céréales et produits dérivés : Détermination de l'humidité.*

RIBA A., SABAOU N., MATHIEU F., LEBRIHI A.2005. *Premières investigations sur les champignons producteurs d'Ochratoxine A dans la filière céréale en Algérie. Symposium Euro-Maghrébin sur les contaminants biologiques, chimiques et la sécurité alimentaire, Fès.*

SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S., FRISVAD J.C. ET FILTENBORG O. 2000. *Introduction of food and airborne fungi. 6th edition. Centraal bureau voor schimmelcultures. Utrecht.*

WEINDENBÖRNER. 2000. *Whole wheat and white wheat flour – the mycobiota and potential mycotoxins. Food Microbiology, 17, 103-107.*

ZIA-UR-RAHMAN, 2006. *Storage effect on nutritional quality of commonly consumed cereals. Food Chemistry, 95, 53-57*