



Manuela Rovea¹, Cinzia Lanzoni¹,
Diego Zorzi², Gianni Formenton¹,
Franco Schiavon¹, Massimo Baldin¹
¹ARPAV Dipartimento Regionale Laboratori
Sede Operativa di Padova
²U.O. Immunotrasfusionale
Azienda Ospedaliera di Padova
gformenton@arpa.veneto.it

COMPOSTI ORGANICI VOLATILI PRODOTTI DA MUFFE

In questo studio si è sviluppato un metodo per rivelare la presenza di muffe negli ambienti confinati, tramite analisi dell'aria e identificazione di composti organici volatili (Microbial Volatile Organic Compounds, MVOCs) caratteristici solo di sviluppo fungino. Si sono selezionati tre ceppi fungini, fatti poi crescere all'interno di contenitori chiusi, esaminando le sostanze volatili sviluppate mediante GC-MS (gas-cromatografia-spettrometria di massa) in varie fasi di crescita.

I composti organici volatili

I composti organici volatili sono un'ampia categoria di molecole organiche caratterizzate da una tensione di vapore tale da renderle evaporabili alle condizioni di temperatura e pressione ambientali. Negli ambienti confinati i composti organici volatili costituiscono una classe rilevante degli inquinanti chimici, sempre presenti poiché emessi da una gran quantità di prodotti: vernici, colle, mobili, tessuti, stampanti, prodotti di pulizia, fumo di tabacco, insetticidi, materiali da costruzione, ecc. Inoltre, dall'esterno possono provenire VOCs emessi da veicoli, industrie ed attività agricole.

I VOCs sono anche prodotti dal metabolismo di agenti biologici (MVOCs) quali le muffe [1, 2]. Responsabile dell'aumento di VOCs di origine microbica, che agevola la crescita sia di batteri che di micromiceti, negli ambienti confinati, è l'umidità. Frequentemente nelle abitazioni danneggiate dall'umidità è stata riscontrata la presenza di *Penicillium* e *Aspergillus*, miceti che sono stati indicati essere i principali responsabili di allergie respiratorie e di sensibilizzazione ad allergeni [3].

L'importanza dei VOCs è stata confermata anche da uno studio condotto in undici città del nord Europa [4], che ha messo in relazione diretta l'asma in bambini e adolescenti con la presenza di VOCs nell'ambiente scolastico. Risultati di studi epidemiologici hanno dimostrato la relazione tra presenza di muffe in abitazioni e patologie respiratorie.

In ambito europeo la maggior parte degli studi realizzati sui composti organici volatili di origine fungina in ambienti confinati per indagini epidemiologiche e per studi di ceppi fungini in "colture pure", sono stati eseguiti o con un campionamento attivo su cartucce adsorbenti o con campionamenti a lungo termine, in genere condotti con campionatori diffusivi e successivo desorbimento chimico o termico dal supporto per l'analisi gascromatografica. Il campionamento su cartucce dipende principalmente dal materiale adsorbente che deve essere stabilito a priori in base alla tipologia di composti che si vogliono determinare, alla durata, alla temperatura e ai volumi di campionamento [5-8].

In questo lavoro sono stati ricercati i VOCs emessi da "colture pure" di tre ceppi fungini, singolarmente coltivati su di un substrato ideale, l'agar destrosio di Sabouraud (SDA) addizionato di cloramfenicolo come antibiotico per evitare la crescita batterica. Sono stati studiati tre ceppi di miceti filamentosi, due ialini e uno dematiaceo: un ceppo standard della specie *Aspergillus brasiliensis* ATCC n° 16404, simile alla *niger* e due ceppi selvaggi del genere *Penicillium* e *Cladosporium*, selezionati dai controlli microbiologici ambientali eseguiti nel nostro laboratorio, isolati e purificati in piastra con SDA.

I tre diversi inoculi fungini ed un substrato senza spore (il bianco), sono stati incubati in contenitori "chiusi" per evitare la contaminazione da VOCs esterni. Dopo la crescita fungina l'aria del contenitore è stata campionata direttamente, concentrata mediante sistema *microscale purge & trap* ed analizzata in gascromatografia con spettrometria di massa.

Caratteristiche delle muffe analizzate

I miceti sono organismi eucarioti che appartengono al regno *Fungi*. La doppia modalità di propagazione dei miceti, sessuata ed asessuata, ha generato una doppia nomenclatura tassonomica. Attualmente il ricorso a tecnologie di tipizzazione sempre più sofisticate ha modificato le conoscenze sulla filogenesi e sull'inquadramento tassonomico dei miceti.

I ceppi fungini coltivati in questo studio appartengono tutti alla divisione o *Phylum* Ascomycota, sono un gruppo estremamente significativo di organismi che include circa il 75% di tutte le specie di funghi censiti [9], si caratterizza per la presenza di ascospore nella forma teleomorfa (riproduzione sessuata) e di un micelio, se presente, settato (mitospore).

Mentre *Aspergillus brasiliensis* e *Penicillium* spp appartengono alla stessa classe Eurotiomycetes e ordine Eurotiales, *Cladosporium* spp appartiene alla classe Dothideomycetes e ordine Capnodiales. Le tre specie fungine appartengono a diverse famiglie e genere.

Effetti nocivi sulla salute a causa di esposizione fungina indoor

L'impatto sull'uomo degli inquinanti indoor può essere causa di una vasta gamma di effetti indesiderati che vanno dal disagio, avvertito a livello sensoriale, fino a gravi affezioni dello stato di salute [10, 11]. L'azione delle muffe sulla salute varia in base alla loro tipologia, alla loro concentrazione e alla suscettibilità di chi frequenta gli ambienti particolarmente contaminati.

L'esposizione fungina all'interno di ambienti chiusi avviene in due modi: attraverso l'infiltrazione di spore provenienti dall'esterno, quali ad esempio *Alternaria* e *Cladosporium*, ed attraverso la crescita spontanea di muffe, quali ad esempio *A. fumigatus*, *Penicillium chrysogenum* e *Fusarium* negli ambienti interni. I funghi possono essere causa di infezioni della cute, delle vie aeree, dei seni nasali e delle unghie ed hanno la capacità di indurre e di perpetuare l'asma

servendosi di molti meccanismi. Sono presenti nell'aria e possono colonizzare il corpo umano per lunghi periodi; possono danneggiare le vie aeree attraverso la produzione di tossine, proteasi e composti organici volatili (VOCs); sono fonte di una vasta gamma di allergeni che presentano numerose similitudini con le proteine eucariotiche umane con la potenzialità di indurre risposte immunitarie auto-reattive. L'ipersensibilità ai funghi condiziona la severità dell'asma.

L'aspergillosi broncopolmonare allergica (ABPA) è una patologia delle vie aeree che complica l'asma e la fibrosi cistica. Si tratta della più comune forma di broncopolmonite allergica da funghi e, di solito, è attribuibile all'*Aspergillus fumigatus*. Nonostante l'*Aspergillus* sia l'agente eziopatologico più frequentemente implicato nell'insorgenza di ABPA, si sono occasionalmente osservati altri casi di broncopolmonite allergica presentanti caratteristiche clinico-radiologiche simili a quelle dell'ABPA causate da altre specie fungine.

La polmonite da ipersensibilità è una patologia rara delle vie respiratorie e si riscontra soprattutto negli adulti, ma anche nei bambini, a seguito di esposizione ad alcune classi fungine tramite umidificatori o da sistemi di riscaldamento ad aria forzata [12].

Oggi l'uomo è più suscettibile al rischio delle micosi, sia per l'aumento dell'età media sia per le terapie antibiotiche, le quali spesso causano stati dismicrobici.

I problemi di salute causati dalla muffa possono presentarsi immediatamente o entro alcuni giorni rispetto all'esposizione (effetti acuti), oppure determinare effetti a lunga durata, che potrebbero non verificarsi immediatamente (effetti cronici).

Le espressioni "*Sick Building Syndrome*" (sindrome dell'edificio malato) e "*Tight Building Syndrome*" (sindrome dell'edificio sigillato) [13], coniate di recente dalla letteratura scientifica, vengono usate nelle situazioni nelle quali gli occupanti di un edificio lamentano disturbi generici non riconducibili ad una causa o a una malattia specifica. La sintomatologia è del tutto aspecifica (irritazione degli occhi, delle prime vie aeree e della cute, tosse, nausea, torpore, sonnolenza, cefalea, astenia) e viene associata alla permanenza nell'edificio, poiché i disturbi si risolvono o si attenuano a seguito dell'allontanamento dallo stesso. È opinione comune che la sindrome sia causata da una interazione di fattori che coinvolgono diversi meccanismi di reazione, e infatti non è stato quasi mai identificato un unico fattore cui si possano imputare le patologie riscontrate.

Coltivazione ed inoculo muffe

Prima di iniziare lo studio dei VOCs, i ceppi fungini selezionati a tale scopo sono stati coltivati in piastra con SDA e, dopo la crescita, prelevati i miceli aerei con il sistema dello scotch su vetrino per l'identificazione morfologica al microscopio.

Tutti i materiali utilizzati sono stati sterilizzati mediante le classiche tecniche di laboratorio (BPL).

Sul fondo di ogni bottiglia destinata allo studio si sono depositati 50 ml circa di SDA con antibiotico. I tre ceppi fungini sono stati singolarmente inoculati in ciascuna bottiglia di coltura.

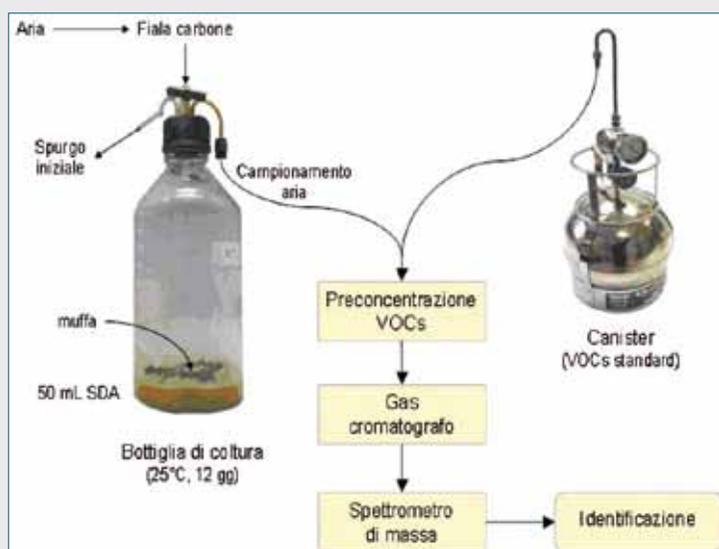


Fig. 1 - Schema di campionamento ed analisi dei VOCs della coltura fungina "pura"

Sono state utilizzate bottiglie di vetro pyrex da 1 litro con tappo a tenuta provvisto di tre connessioni per i necessari collegamenti.

Le 4 bottiglie di coltura contenevano:

- la prima il bianco, ovvero solo terreno nutriente costituito da 50 ml di SDA con cloramfenicolo (antibiotico);
- la seconda standard ATCC *Aspergillus brasiliensis* su 50 ml di SDA + CAF;
- la terza ceppo selvaggio di *Cladosporium* spp su 50 ml di SDA + CAF;
- la quarta ceppo selvaggio di *Penicillium* spp su 50 ml di SDA + CAF.

I contenitori sono stati chiusi e nel caso di collegamento con l'aria esterna, necessario per riequilibrare la pressione dell'aria dopo il campionamento, è stato aperto lo sfiato interponendo una cartuccia a carbone attivo per impedire l'entrata di VOCs presenti nell'ambiente esterno (Fig. 1).

Le colture sono state mantenute in incubatore a 25 °C.

Analisi in gascromatografia (GC) e spettrometria di massa (MS)

I VOCs prodotti durante la crescita delle muffe all'interno delle "bottiglie di coltura", sono stati analizzati con campionamento istantaneo, per aspirazione diretta dalle bottiglie di coltura al sistema analitico *microscale purge & trap* Entech 7100 e analizzate con GC-MS Perkin Elmer modello Autosystem XL, equipaggiato con colonna capillare Equity 1 della ditta Supelco 60 m x 0,32 mm con 1,0 µm di spessore e spettrometro di massa Perkin Elmer Mass-Gold con software di acquisizione Turbo Mass vers. 5.4.2, seguendo il metodo EPA TO 15 [14].

L'analisi è stata eseguita aspirando 40 ml di campione e iniettando contemporaneamente nel sistema *microscale purge & trap* 100 ml di una miscela gassosa di standard interni, quali 1,4-bromofluorobenzene, 1,4-difluorobenzene, bromoclorometano e clorobenzene

deuterato in azoto, ad una concentrazione pari a 20 µg/m³, ottenuta per diluizione da una miscela certificata pari a circa 1 mg/m³. I composti costituenti la miscela di standard interno sono selezionati in modo da non interferire con i VOCs presenti in atmosfera e con quelli emessi dalle muffe. La spettrometria di massa permette l'immediata identificazione qualitativa dei composti in analisi, ma non avendo a priori una taratura dei VOCs tipici delle muffe, è importante che gli standard interni non siano interferiti, consentendo una valutazione semiquantitativa.

Analisi dei dati

L'aria delle quattro bottiglie di coltura è stata analizzata per sei volte a intervalli di: 4, 7, 12, 18, 28 e 33 giorni dall'inoculo.

Nel contenitore con solo SDA senza inoculo, durante i 33 giorni non è stata osservata alcuna crescita macroscopica di microrganismi.

Tutte le sostanze volatili presenti sia come contaminanti del bianco sia come metaboliti sono individuate tramite i tempi di ritenzione gascromatografici e la successiva caratterizzazione dei loro spettri di massa.

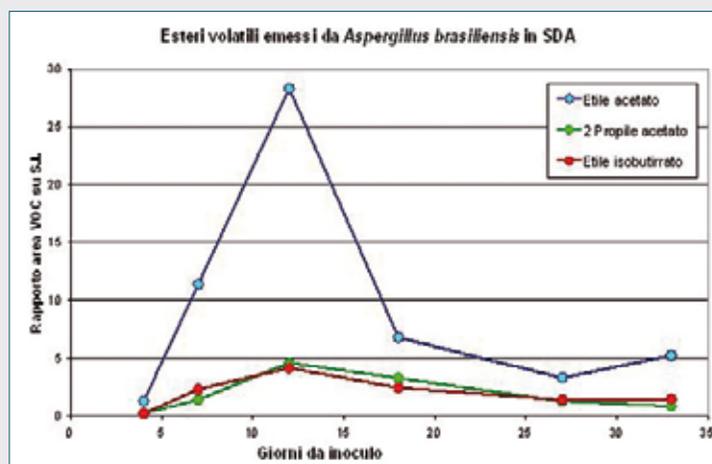


Fig. 2 - Produzione di esteri volatili emessi da *Aspergillus brasiliensis* in "coltura pura" durante lo studio

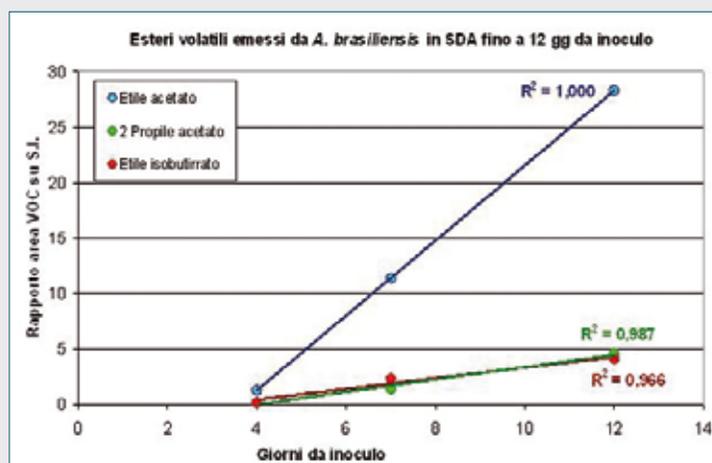


Fig. 3 - Coefficiente di linearità delle quantità di alcuni esteri volatili prodotti da *Aspergillus brasiliensis* emessi fino a dodici giorni dall'inoculo

Cinetica dei composti ossidati emessi dalle muffe

Dopo il campionamento per l'analisi dei VOCs i contenitori sono stati riportati a pressione atmosferica aprendo, per alcune ore, il tubicino posto sul tappo della bottiglia collegato alla cartuccia di carbone attivo, quindi richiusi per evitare contaminazioni ambientali.

Questa modalità sperimentale se da una parte preserva da contaminazioni di VOCs ambientali dall'altra non assicura un continuo ricambio d'aria, comportando alla lunga una deficienza di ossigeno e, di conseguenza, un ambiente anossico che a sua volta sarà la causa di una variazione del metabolismo fungino.

Con l'analisi dei dati possiamo valutare il limite temporale entro cui i miceti crescono in condizioni ottimali, così da elaborare solo i VOCs emessi in condizioni di crescita reale.

Le condizioni ottimali dell'esperimento possono essere monitorate dall'andamento nel tempo delle quantità di alcuni VOCs, in particolare dei composti organici volatili presenti nella forma più ossidata, come gli esteri.

Nel caso dell'*Aspergillus brasiliensis* ATCC n° 16404, gli esteri maggiormente presenti come l'etile acetato, il 2-propile acetato e l'etile isobutirrato, presentano nel corso dei 33 giorni di analisi un andamento simile anche se con velocità di produzione diverse, rappresentati nella Fig. 2.

La concentrazione degli esteri aumenta nel tempo, con un massimo fino a 12 giorni dall'inoculo per poi cambiare pendenza e diminuire; questo andamento risulta molto più accentuato per l'estere più volatile ed emesso in maggior quantità: l'acetato di etile.

Il grafico successivo (Fig. 3) rappresenta l'interpolazione delle prime tre misure per questi tre esteri, dal quale si deduce una crescita lineare: l'acetato di etile con una pendenza di reazione più elevata ha un coefficiente di correlazione $R^2=1,000$ mentre per 2-propilacetato ed etile isobutirrato un coefficiente di linearità rispettivamente di 0,987 e 0,966.

Dopo i primi dodici giorni dall'inoculo si ha una variazione nella cinetica di produzione dei composti ossidati anche per *Penicillium* spp e *Cladosporium* spp.

Nel caso del *Penicillium* spp gli andamenti degli esteri volatili sono simili a quelli visti per *Aspergillus brasiliensis*, complessivamente rappresentati nel relativo grafico (Fig. 4); si nota che dopo un aumento durante i primi 12 giorni dall'inoculo la quantità degli stessi diminuisce o rimane quasi costante nel tempo.

L'interpolazione delle quantità emesse nei primi dodici giorni dall'inoculo per acetato di etile, 2-propilacetato ed etile isobutirrato ha fornito un coefficiente di linearità rispettivamente di 0,952 di 0,993 e di 0,980 (Fig. 5).

Il ceppo fungino *Cladosporium* spp inizia a produrre il 2-propile acetato solo dopo sette giorni e aumenta, con una crescita non lineare, fino alla misura eseguita al diciottesimo giorno dall'inoculo per poi variare la cinetica come visualizzato nel Fig. 6.

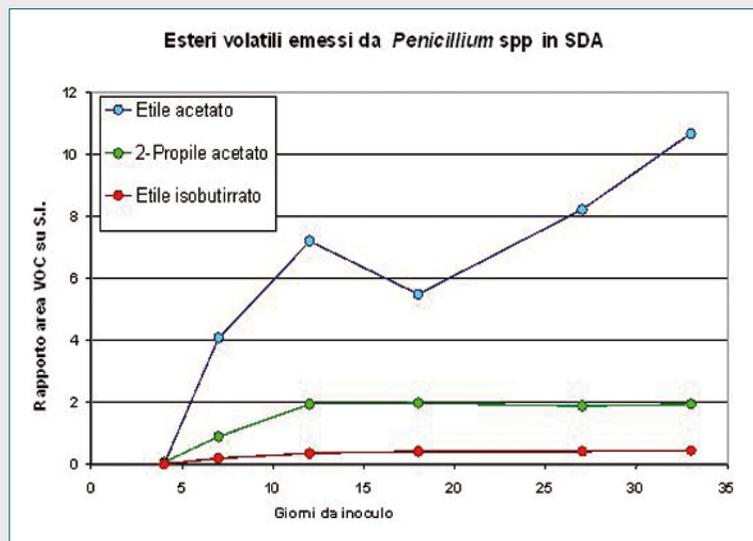


Fig. 4 - Cinetica di produzione di alcuni esteri volatili emessi da *Penicillium* spp

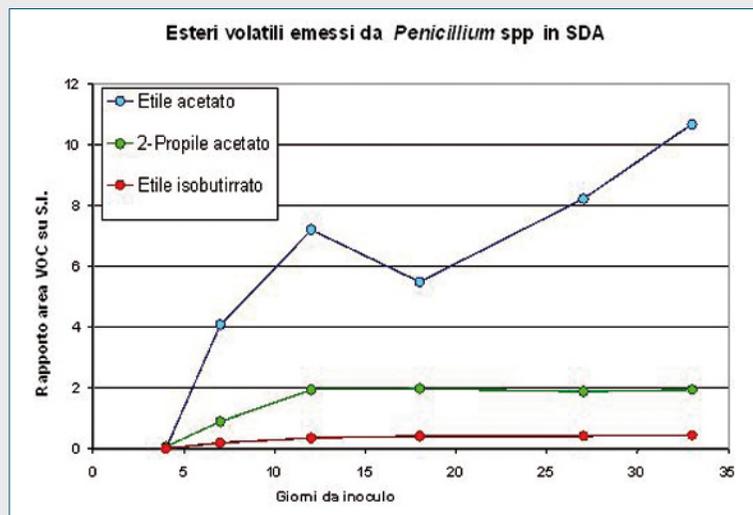


Fig. 5 - Coefficiente di linearità delle quantità di alcuni esteri volatili prodotti da *Penicillium* spp emessi fino a dodici giorni dall'inoculo

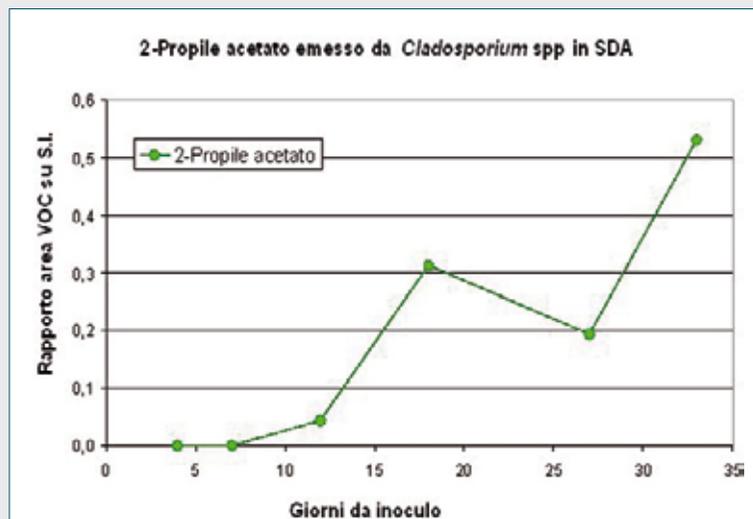


Fig. 6 - Cinetica di produzione di 2-propile acetato emesso da *Cladosporium* spp

Tab. 1 - Elenco dei metaboliti volatili emessi solo da muffe cresciute in SDA

Campione VOCs	ASPERGILLUS brasiliensis	PENICILLIUM spp	CLADOSPORIUM spp
Butano		<	
Metil-acetato			+
1-Propanolo (alcol propilico)	<	<	
Acetato di etile	+++	+++	
2-Butanolo	<		
2-Metil-1-propanolo (isobutanolo)	++	+	
2-Propil-acetato (isopropilacetato)	++	++	+
2-Pentanone	<	<	
1-Butanolo		<	
Metil-isobutirrato	<	<	
2,5-Dimetil-furano	+	<	+
n-Propil-acetato	<		
Dietilacetale	<		
3-Metil-1-butanolo	++	+	+++
2-Metil-1-butanolo	++	+	
2,2,4,5-tetrametil-1,3-diossolano		<	++
Etil-isobutirrato	++	+	
Isobutil-acetato	<		
Metil-2-metil-butanoato	<		
Etil-butanoato	<		
2,3,5-Trimetil-furano	<		
Isopropil-butirrato	<	<	
Isoamilacetato	<		
2-Metil-1-butilacetato	<		
Isopropil-2-metil-butanoato		<	
Nonano		<	
Isobornil-formiato	<	<	
Numero totale VOCs	22	18	6
Percentuale abbondanza VOC: +++=>15; ++=<15 e >5; +<5 e >1; <=<1; cella vuota=VOC assente			

Metaboliti caratteristici delle muffe

Da questo studio le tre differenti tipologie di VOCs rilevate sono:

- *VOCs da SDA*: i VOCs rilevati in SDA senza inoculo sono unicamente dovuti al substrato stesso, dunque non sono composti identificativi di sviluppo fungino;

- *VOCs da muffe*: i VOCs prodotti solo da muffe saranno quelli rilevati nelle varie bottiglie di coltura inoculate con muffe a meno dei VOCs determinati in SDA senza inoculo.

Vi è la possibilità che la mera sottrazione, non avendo la stessa varianza per tutti i campioni, porti a considerare un numero minore di composti costitutivi di un profilo fungino;

- *VOCs da SDA e muffe*: altri composti come il 2-metil-furano, il cui conteggio TIC assoluto determinato nell'*Aspergillus brasiliensis* è dieci volte superiore rispetto al bianco e alle altre due muffe, o il toluene il cui conteggio ionico totale (TIC) per *Aspergillus brasiliensis* è circa tre volte superiore rispetto al bianco, o ancora lo stirene rilevato con una abbondanza TIC sei volte maggiore nell'agar inoculato con ceppo tipo *Penicillium* spp rispetto al bianco, possono essere originati/dipendenti, oltre che dal substrato, anche dal metabolismo delle muffe.

Nel prosieguo di questo primo lavoro anche questi composti non saranno considerati come traccianti fungini. Peraltro composti come toluene, stirene e xileni sono generalmente presenti e diffusi tra i VOCs ambientali (BTEXS) in quanto emessi da altre fonti "chimiche", non solo da microrganismi.

L'elenco dei VOCs prodotti solo da muffe, con una valutazione semi-quantitativa definita in legenda, è riportato in Tab. 1.

Tra i metaboliti non è riportato per tutti tre i ceppi fungini l'alcol isopropilico, che risulta essere la sostanza di gran lunga a maggiore concentrazione.

I metaboliti fungini identificati sono principalmente rappresentati nelle classi degli alcoli e degli esteri, in modo minore da composti eteri, nello specifico 2,5-dimetilfurano e tetrametil-1,3-diossolano, mentre risultano trascurabili i metaboliti per le classi dei chetoni e degli idrocarburi.

Dal punto di vista quantitativo i principali composti volatili emessi dalle muffe sono l'alcol 2-propanolo e l'acetato di etile. Numerosi lavori scientifici hanno dimostrato che composti molto volatili da C2+C4, quali 2-propanolo e acetato di etile, non possono essere considerati specifici di muffe, in quanto prodotti anche da numerosi organismi viventi come risultato di processi fondamentali della respirazione, quali glicolisi e ciclo di Krebs.

Inoltre l'alcol isopropilico non può essere considerato un tracciante fungino perché spesso lo si trova negli ambienti confinati come quelli domestici, ospedalieri e scolastici in quanto usato comunemente per svariati impieghi come detergente, essendo sia un ottimo sgrassante che un disinfettante, utilizzato come additivo per carburanti ed infine è un importante intermedio per sintesi farmaceutiche e cosmetiche.

Per la valutazione di tutti i VOCs di Tab. 1, bisogna premettere che questi, essendo determinati in bottiglie di coltura chiuse, sono in quantità più "concentrata" rispetto a quelli che potrebbero essere rilevati in ambienti di vita confinati.

In questo primo studio cautelativamente si darà la precedenza e si valuteranno maggiormente i composti determinati nelle colture standard in concentrazione fino all'1%. Con ciò non si vogliono escludere i composti minori ma certamente una loro migliore valutazione potrà essere fatta comparandoli con i risultati ottenuti da ulteriori

prove eseguite con altri substrati e soprattutto con la determinazione in ambienti confinati.

Sono stati identificati quattro VOC presenti nei tre ceppi fungini: 2-propanolo, 2-propil-acetato, 2,5-dimetilfurano e 3-metil-1-butanolo. L'alcool isopropilico (2-propanolo) non può essere considerato un marker fungino, essendo uno dei prodotti dei principali processi della respirazione di organismi viventi, inoltre si riscontra spesso in ambienti confinati in quanto componente di detergenti, disinfettanti, sgrassanti e solventi industriali.

Il 2-propil-acetato emesso da tutti i ceppi fungini, è un estere che può essere ottenuto come prodotto di esterificazione di acido acetico e 2-propanolo, componenti presenti nelle colture con SDA inoculato con muffe. L'acetato di isopropile è utilizzato dall'industria come solvente per cellulosa, plastica, materie oleose e grasse. Dunque anche l'isopropilacetato è un VOC che, sebbene con molta minore frequenza dell'alcool isopropilico, potrebbe essere possibile riscontrare in ambiente confinati.

Altri composti di origine fungina rilevanti hanno struttura eterea, come l'anello eterociclico a cinque termini quale il 2,5-dimetil-furano, comune ai tre i ceppi fungini studiati, e un composto non citato in letteratura per essere caratteristico di sviluppo fungino, come il 2,2,4,5-tetrametil-1,3-diossolano, rilevato soprattutto in *Cladosporium* spp.

Composti emessi dalle muffe e riscontrati in considerevole quantità sono i tre alcoli: 2-metil-1-propanolo, 3-metil-1-butanolo e 2-metil-1-butanolo; nelle muffe della classe *Eurotiomycetes*, i rapporti quantitativi tra questi alcoli risultano uguali. Invece nella muffa *Cladosporium* spp è stato rilevato solo l'alcool 3-metil-1-butanolo. La diversa presenza di questi tre alcoli tra i ceppi di *Aspergillus* e *Penicillium* da una parte e *Cladosporium* dall'altra è confermata da risultati ottenuti in altro lavoro scientifico [2].

Nelle muffe della classe *Eurotiomycetes* è frequente l'identificazione degli stessi composti organici volatili, infatti oltre agli alcoli appena citati, in entrambe le muffe sono presenti anche: 1-propanolo, 2-pentanone, metil-isobutirrato, etil-isobutirrato, isopropil-butirrato. Ciò potrebbe far supporre che alla base di questa produzione di composti organici volatili simili, ci sia un metabolismo simile per le muffe ialine della stessa classe *Eurotiomycetes*, mentre sembra essere un po' diversa la produzione di metaboliti volatili da parte di *Cladosporium* spp, micete classificato nella stessa divisione tassonomica degli *Ascomycota* ma appartenente alla classe *Dothideomycetes*. Il diverso profilo dei VOCs che potrebbe essere rappresentativo di un diverso metabolismo di muffe perché di classi diverse, si può dedurre anche da Fig. 7, che mette a confronto solo alcuni, i principali, metaboliti presenti in Tab. 1 per i tre ceppi fungini studiati.

Conclusioni

I composti organici volatili studiati nei primi dodici giorni di crescita, sono stati prodotti da "colture pure" di muffe molto diffuse nell'am-

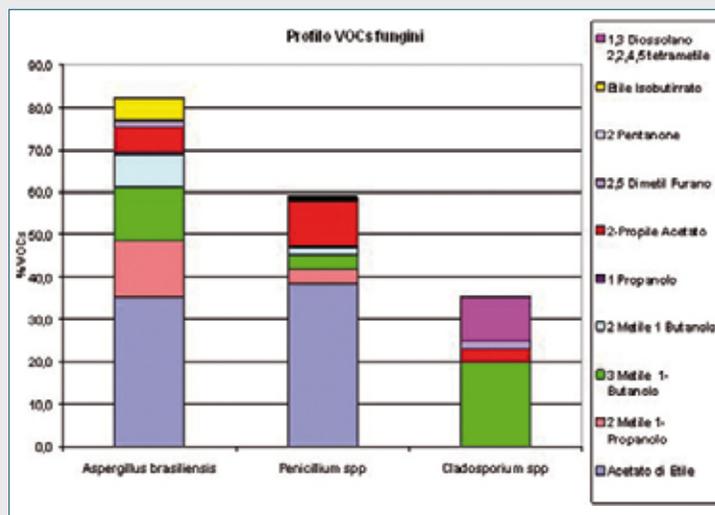


Fig. 7 - Confronto dei profili dei principali metaboliti per specie fungina

biente, quali un ceppo standard del genere *Aspergillus* e i ceppi selvaggi del genere *Penicillium* e *Cladosporium*, inoculati in SDA.

L'analisi semiquantitativa in gascromatografia e spettrometria di massa del profilo dei VOCs rende evidente come primo cambiamento un consumo dei composti volatili, in particolare delle aldeidi ramificate, e la generazione di nuove molecole attribuibili al metabolismo delle muffe appartenenti principalmente alle categorie chimiche di alcoli, esteri ed eteri.

Questo lavoro ha permesso l'identificazione semiquantitativa di un discreto numero di composti organici volatili prodotti unicamente dal metabolismo fungino, di cui quelli maggiormente emessi sono comuni a tutti i ceppi fungini: 2-propanolo, 2-propil-acetato, 2,5-dimetilfurano e 3-metil-1-butanolo.

La maggior parte dei VOCs determinati in questo studio sono citati nella letteratura scientifica, ad eccezione del composto eterociclico 2,2,4,5-tetrametil-1,3-diossolano determinato soprattutto nel ceppo fungino del genere *Cladosporium*.

Da questo studio si rileva che ceppi fungini appartenenti a classi tassonomiche differenti presentano profili gascromatografici differenti; ciò dovrebbe essere ulteriormente confermato mediante l'analisi dei MVOCs prodotti da muffe appartenenti ad altre classi differenti da quelle indagate.

La determinazione di muffe in ambienti confinati con l'analisi di MVOCs è complessa per i numerosi composti emessi da ceppi fungini diversi con substrati diversi, sommati alle numerose emissioni da materiali da costruzione e arredi che possono interferire con la loro identificazione.

Proprio per questa complessità, oltre alla ricerca di composti specie specifici si pensa possa essere vantaggioso creare un profilo con un grande numero di VOCs come sicuri traccianti fungini, in modo da ridurre il rischio di false interpretazioni con composti emessi da altre sorgenti indoor di tipo chimico e batterico.

Alcuni VOCs determinati nei tre ceppi fungini potrebbero essere singolarmente presenti nell'ambiente confinato, tuttavia è la contem-

poranea presenza di più sostanze, e cioè il profilo cromatografico dell'aria campionata che risulta risolutivo per evidenziare la presenza di muffe. Il riconoscimento di VOCs fungini in ambienti confinati potrebbe procedere secondo due stadi: una prima discriminazione tra i VOCs biologici e quelli antropogenici di origine chimica, verificando la presenza di più composti tipici della respirazione microbica che essendo prodotti in grande quantità, come 2-propanolo, acetato di etile e acetaldeide, sono di facile determinazione. Successivamente si avrebbe la conferma, verificando la presenza di alcoli ramificati, esteri volatili, furani e altri composti (diossolani) particolari di muffe. Una raccolta di tracciati cromatografici di muffe di differenti classi coltivate in purezza può, come evidenziato in questo lavoro, permettere la creazione di una banca dati, cui fare riferimento per il riconoscimento della contaminazione fungina.

La tecnica utilizzata in questo lavoro può essere facilmente adattata anche per il prelievo dell'aria di ambienti chiusi contaminati da muffe o per prelievi in luoghi di difficile accesso, come per esempio condotte di areazione o di condizionamento [15].

Il prelievo dell'aria confinata, tramite *canister*, può essere eseguito in modo istantaneo. Il tempo per l'intero processo analitico, comprensivo di campionamento, può essere molto ridotto; ciò consente l'individuazione dei MVOCs e quindi di potenziale contaminazione da muffe in modo più rapido di quanto può avvenire tramite un procedimento di riconoscimento microbiologico dei ceppi fungini.

Le sostanze volatili sono inoltre prodotte anche in assenza di attività sporigena, quindi possono essere degli utili indicatori in una fase precoce di contaminazione.

Il limite di quantificazione molto basso del metodo, inferiore a 1 µg/m³, può facilitare il riconoscimento di MVOCs presenti anche in esigua quantità, questo limite può essere raggiunto anche con tecnica della microestrazione in fase solida (SPME), mentre risulta difficilmente raggiungibile con tecniche di prelievo con fiala.



Bibliografia

- [1] S. Moularat *et al.*, *Chemosphere*, 2008, **72**, 224.
- [2] S. Matysik *et al.*, *Chemosphere*, 2009, **76**, 114.
- [3] Guidelines for Indoor Air Quality: Dampness e Mould, World Health Organization, Europe, 2009.
- [4] R.D. Edwards *et al.*, *Atmospheric Environment*, 2006, **40**, 5685.
- [5] A.S. Claeson *et al.*, *Journal of Environmental Monitoring*, 2007, **9**, 240.
- [6] S. Moularat *et al.*, *Science of the Total Environment*, 2008, **407**, 139.
- [7] C. Hachem *et al.*, *Building and Environment*, 2009, **44**, 1691.
- [8] M. Kuske *et al.*, *Building and Environment*, 2005, **40**, 824.
- [9] E.W. Koneman *et al.*, *Practical Laboratory Mycology*, The Williams & Williams Company, Baltimore, 1973, 2nd Edition.
- [10] G. Muzi *et al.*, *Giorn. Ital. Med. Lav. Ergon.*, 2004, **26**(4), 364.
- [11] F. Mondello, *Funghi patogeni per l'uomo: generalità e prospettive*, ISSN 1123-3117, Rapporti ISTISAN 08/10.
- [12] F. Bruni *et al.*, *Pneumologia Pediatrica*, 2007, **27**, 27.
- [13] X. Zhang *et al.*, *Science of the Total Environment*, 2012, **430**, 75.
- [14] Compendium of Methods for the Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air Second Edition Compendium Method TO-15 Determination Of Volatile Organic Compounds (VOCs) In Air Collected In Specially-Prepared Canisters And Analyzed By Gas Chromatography/ Mass Spectrometry (GC/MS) EPA/625/R-96/010b.
- [15] Gruppo di Studio Nazionale sull'Inquinamento Indoor dell'Istituto Superiore di Sanità, "Strategie di monitoraggio dei composti organici volatili (COV) in ambiente indoor", 2011, 1-36.

ABSTRACT

Volatile Organic Compounds Produced by Moulds

In this study a method for detection of moulds is developed and microbial volatile organic compounds (MVOCs), produced by moulds, are identified. Some specific markers of fungal growth are determined in relationship with moulds species. Three pure fungal strains were selected and were grown inside closed bottles. The produced MVOCs were sampled by a microscale purge & trap systems and analyzed by GC-MS instrument. The volatile compounds are determined in different phases of moulds growth