

Études sur la moisissure verte des prunes d'Ente

L'Aspergillus Mangini :

Ses exigences nutritives, ses conditions de développement

par

Mireille MOREAU,

Docteur ès Sciences.

Le problème des pruneaux moisissés est vraisemblablement contemporain de la fabrication des premières prunes séchées ; mais tant que le traitement des fruits fut artisanal, donc quantitativement limité, les accidents dus aux Champignons furent assez mal matérialisés et des tours de mains variés, acquis par empirisme, servaient à camoufler les imperfections de la méthode : un séchage plus poussé évite aux moisissures de se développer... mais ce n'est pas sans compromettre les qualités organoleptiques du fruit ; une décoction de thé fort est très favorable au maquillage des taches de Monilia !

La fabrication industrielle ne peut s'accommoder de tels artifices ; la clientèle sollicitée en toutes saisons par tant de fruits variés veut trouver dans le pruneau non plus un dessert médiocre ou un remède de bonne femme, mais un fruit de haute qualité.

Quand, voici deux ans, il nous fut demandé d'examiner des pruneaux atteints de moisissures en cours de fabrication ou de conservation nous ne soupçonnions pas tout l'intérêt que pourrait présenter cette étude en apparence si limitée.

Les moisissures des pruneaux.

Notre but fut d'abord d'établir la flore des pruneaux en cours de fabrication. Le producteur attribuait alors un très grand rôle au *Monilia* qui sévissait sur ses pruniers (photo 1).

Tous les essais d'isolement, d'infection par contact que nous avons faits au cours des deux campagnes furent négatifs. Les prunes atteintes de *Monilia* et qui n'ont pas été éliminées avant leur passage dans le tunnel de séchage garderont visibles les stromas du parasite parce que leurs houppettes blanches tranchent sur le fond noir, mais le Champignon est tué. A sa sortie du tunnel de séchage, le pruneau est stérile, tout développement fongique ultérieur est dû à une

infection *a posteriori*. Ce point acquis, comme les moisissures sont souvent réparties par nids, il importait de savoir si ces pruneaux issus de prunes malades n'étaient pas les premiers à propager la maladie : l'expérience a prouvé qu'il n'en était rien et qu'il est même plus difficile de faire attaquer par la moisissure verte un pruneau monilié qu'un pruneau sain.

Dans des cas d'humidité ambiante très élevée, sur des pruneaux très humides, nous avons assisté au développement du *Rhizopus nigricans* (photo 2), de l'*Aspergillus niger*, du *Penicillium crustaceum*, moisissures très banales des denrées alimentaires.

Il nous est arrivé d'observer aussi des pruneaux en fermentation et présentant des développements de levures. Mais ces différents types sont accidentels et

relèvent de conditions de séchage ou de conservation anormales. Une seule et même moisissure doit être incriminée dans les accidents de fabrication de pruneaux : c'est un *Aspergillus* ; mais si l'étude floristique est réduite, le problème phytopathologique n'est pas pour autant privé de son intérêt tant est complexe l'identification précise de ce Champignon, tant est remarquable son adaptation au support.

Essais de localisation de l'infection.

Les examens de nombreux lots prélevés aux divers stades de préparation prouvent que la prune semble une proie facile pour l'*Aspergillus* dès l'entreposage qui suit sa sortie du tunnel de séchage. Si les conditions sont favorables dès la spore contaminatrice, un gros mycélium lâche, blanc, fragile, s'irradie, émettant de véritables stolons, il adhère alors peu au support ; sa croissance essentiellement aérienne lui permet d'occuper rapidement ainsi plusieurs pruneaux. A son départ, chaque stolon différencie plusieurs filaments qui s'irradient à leur tour si bien que le feutrage mycélien s'épaissit, alors qu'au centre de la colonie les premières têtes conidiennes apparaissent.

Si des opérations de calibrage et d'ébouillantage interviennent, le mycélium, très évanescent, résistera mal à ces traumatismes, mais de par la topographie même du pruneau, des têtes conidiennes sont formées au fond des plis.

Des examens faits au microscope stéréoscopique ont prouvé que si l'eau n'est pas maintenue effectivement bouillante pendant plusieurs minutes après l'introduction des pruneaux, ces têtes conidiennes bien protégées n'ont pas le temps d'être détruites par la chaleur ; elles deviennent les points d'infection nouveaux et multiples des pruneaux prêts à l'emballage, d'autant que leur position leur assure un degré hygrométrique plus élevé dans une atmosphère confinée.

Le nouveau mycélium émis par tout un amas de spores s'épaissit et tandis qu'il réunit de proche en proche les pruneaux en « nids » il différencie, sur les fruits du centre, de très nombreuses têtes conidiennes d'un beau vert olive. Avec l'âge, les têtes conidiennes deviennent vert grisâtre alors que des filaments jaunes virant à l'orange et au rouge brique s'insèrent entre elles, entourant de multiples petits périthèces dans les mêmes coloris. Ce stade final n'est pas exceptionnel quand des pruneaux contaminés ont été enfermés dans les boîtes métalliques en attendant la vente. On juge facilement de la déconvenue du consommateur à la vue de pruneaux si richement colorés !

Cette première série d'observations montre que des accidents sont possibles durant toute l'existence du pruneau ; des mesures de désinfection des locaux : murs, bois, atmosphère, apparaissent recommandables ; seules, elles réduiront les points de contamination mais ne supprimeront pas la contagion. Celle-ci pourrait être résolue par un traitement fongicide direct du fruit : les possibilités sont excessivement limitées et les essais faits soit avec des concentrations variées d'oxyde d'éthylène, soit par immersion des fruits dans l'acide sorbique furent décevants. Ce sont les susceptibilités du parasite, les conditions de réceptivité de l'hôte, qu'il faut essayer de préciser.

Mise en culture du parasite. Son identification.

Nos premiers essais de mise en culture furent des échecs : sur le milieu de Czapek bien adapté aux *Aspergillus* en général, la Maltea à 1 et 2 %, l'avoine, la pomme de terre maltosée, les semis conidiens, ceux de périthèces, enfin des semis d'asques isolés sous le microscope restaient sans germer.

L'étude microscopique des périthèces produits sur pruneaux avec leurs ascospores lenticulaires typiques munies de deux anneaux équatoriaux (fig. 1, l) fait placer cet *Aspergillus* dans le groupe *glaucus*. THOM et RAPER (1945) dans leur monographie du genre *Aspergillus* recommandent pour les espèces de ce groupe un Czapek non à 3 mais à 20 % de saccharose, car elles « se développent sur des produits caractérisés par une haute pression osmotique », « l'habitat classique étant les échantillons d'herbier insuffisamment secs ».

Sur milieu de Czapek gélosé à 20 %, le Champignon des pruneaux se développe, mais si les périthèces se forment en abondance, de nombreux asques sont abortifs ; quant aux têtes conidiennes, elles sont rares et aberrantes. L'étude microscopique et les caractères cultureux permettent de préciser qu'il s'agit de l'*Aspergillus Mangini* (Mangin) Thom et Raper (= *Eurotium herbariorum* var. *minor* Mangin).

Malgré la grande différence que présentent entre elles les cultures pures et les colonies sauvages de l'*Aspergillus Mangini*, des fragments de cultures fructifiées infectent des pruneaux sains placés à 27°, en boîte de Pétri en présence, mais à distance, d'un tampon d'ouate saturé d'eau ; les colonies essentiellement conidiennes revêtent en quelques jours l'aspect de celles issues d'infections naturelles. La réalisation de cultures pures s'avère donc un excellent moyen d'expérimentation.

Les exigences en glucides de l'*Aspergillus Mangini*.

L'*Aspergillus glaucus* est connu depuis très longtemps et les études physiologiques dont il fut l'objet sont nombreuses. KLEBS (1896), dans un remarquable travail, montre le rôle que peuvent jouer sur ce Champignon le milieu et la température. Il établit déjà que des milieux riches en glucides sont indispensables tant à la germination des conidies qu'à la croissance des cultures et que, selon la nature du milieu et la température, les aspects culturaux sont très différents. Sur des milieux contenant 80 % de sucre de canne ou 80 % de dextrine, la croissance est rapide mais il ne semble pas avoir dépassé cette concentration.

D'autre part, il observe que sur les substrats secs (pain, pomme de terre, gélatine) la température optimale est 28° alors qu'elle n'est que de 13 à 15° pour des milieux plus humides ; il en arrive à considérer que les concentrations élevées équivalent à des milieux

secs et que la croissance a un lien avec la pression osmotique.

MANGIN (1908-1909) réunissait une importante collection de souches d'*Aspergillus glaucus* (d'origines diverses, dont une isolée de pruneaux) et, tant par l'étude précise des fructifications parfaites que par la culture sur milieux nutritifs variés, établissait que l'*Aspergillus glaucus* était en fait un groupe d'espèces ayant des affinités mais dont les exigences nutritives et thermiques étaient différentes.

THOM et RAPER (1945), établissant les bases d'une systématique du genre *Aspergillus*, sanctionnaient les conclusions de MANGIN en les complétant.

On peut dès lors regretter que des publications récentes, telles celles de HEINTZELER (1939), de STILLE (1942 et 1948), de SCURTI (1948), de VON SCHELHORN (1950) étudient le rôle de l'humidité relative, de la température, de la composition du milieu nutritif, du pH sur la germination et la croissance d'*Aspergillus* du

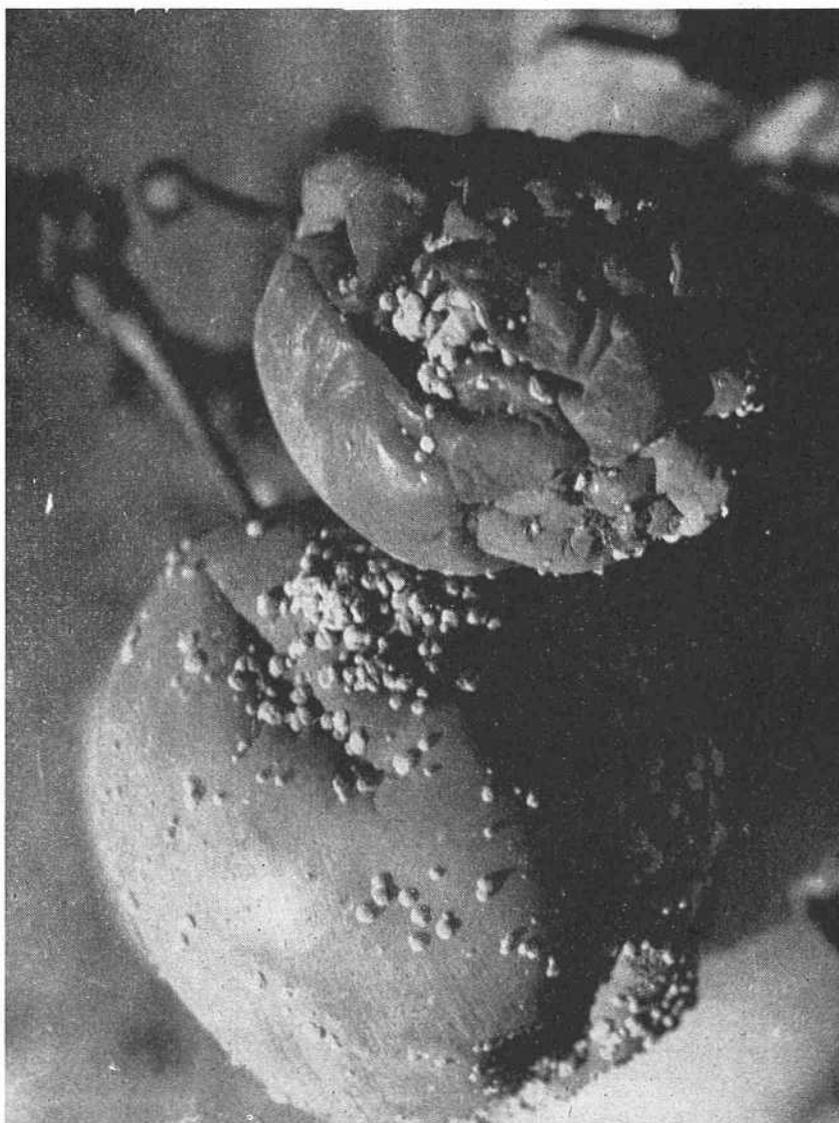


PHOTO 1. — Attaque de *Monilia* sur prunes.
(Cliché Claude Moreau.)

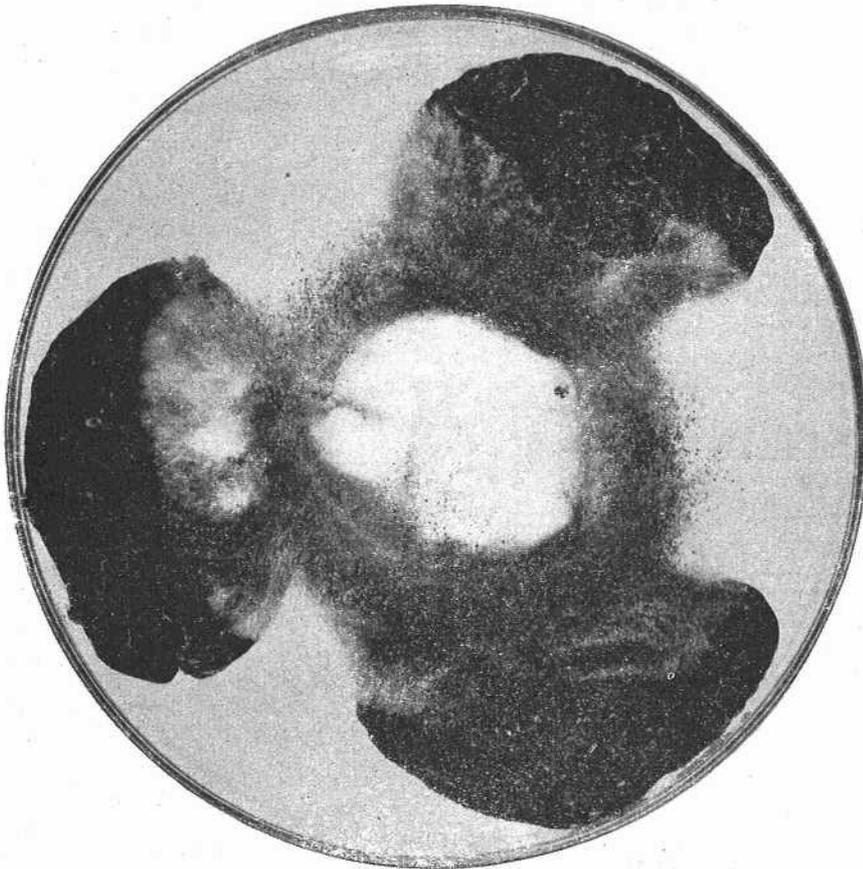


PHOTO 2. — Développement de *Rhizopus* sur pruneaux apparemment sains mais disposés en boîte de Pétri à 25° en présence d'un tampon de coton hydrophile humide. (Cliché Renée Haccard.)

groupe *glaucus* sans détermination précise de l'espèce. Feignant ainsi d'ignorer qu'il y a, dans le groupe, plus de vingt espèces, présentant entre elles des diversités de comportement, les auteurs ont fourni des résultats très différents alors que chacun les a voulu d'une précision rigoureuse !

Nous avons cherché à préciser quelles pouvaient être, en milieu synthétique, celui de Czapek, liquide, les doses toxiques de sucres.

Lors d'une première série d'essais les concentrations suivantes furent utilisées : 200, 300, 400, 500, 750 et 1 000 g de sucre de betterave (nous réserverons le nom de saccharose au produit pur) ou de glucose Massé par litre de solution-mère. (La dernière des concentrations étant supérieure à celle utilisée par KLEBS en 1896). Après ensemencement et incubation deux semaines à 27°, l'examen des cultures montre que :

- a) toutes les concentrations permettent la croissance,
- b) les caractères culturels varient beaucoup avec la concentration,
- c) 400 g de sucre sont au moins nécessaires à une

rapide fructification parfaite et 750 g pour qu'apparaissent les premières têtes conidiennes normales.

Une nouvelle série d'essais avec respectivement : 1 000, 1 500, 2 000, 2 500 et 3 500 g de sucre de betterave ou de glucose Massé par litre de solution de Czapek, ont donné lieu aux remarques suivantes après deux semaines de culture :

a) A la même concentration, les aspects culturels sur les deux sucres sont différents. De frêles efflorescences mycéliennes sont encore visibles à la concentration de 3 000 g par litre de sucre de betterave ; à celle de 2 500 g, aucune germination ne peut être observée au microscope sur glucose Massé. Étant donné l'importance que peuvent jouer à de telles concentrations des impuretés éventuellement toxiques, il s'avérait indispensable de faire de nouvelles cultures sur sucres purs.

b) Les concentrations élevées permettent l'épanouissement de la forme conidienne et la régression de la forme périthéciale chez les deux sucres.

Ainsi, les concentrations relativement faibles assurent-elles la production des périthèces, les plus éle-



PHOTO 3. — Infection spontanée d'*Aspergillus Mangini* sur des pruneaux présumés sains disposés en boîte de Pétri à 27° en présence d'un tampon de coton hydrophile humide.
(Cliché Renée Haccard.)

vées, celles des conidies exclusivement. Cette exigence nutritive très différente pour les deux types de fructifications méritait une confirmation.

L'alimentation glucidique de l'*Aspergillus Mangini* en fonction de la température.

Les expériences précédentes, essayant de définir les limites de croissance de l'*Aspergillus Mangini* sur des sucres, furent effectuées à 27°.

Dans un grand essai comparatif, utilisant du glucose et du saccharose purs, nous avons fait varier non seulement la concentration mais aussi la température.

Nous citerons succinctement nos conditions d'expérience.

La solution-mère de Czapek fut ajustée à pH 5,5, avant l'adjonction des sucres ; c'est à un même volume de cette solution-mère que furent ajoutées les quantités de sucre assurant les concentrations suivantes : 100, 200 et par 200 g jusqu'à 3 200 g par litre de Czapek ; le volume de liquide contenu dans les tubes est donc variable.

Pour faciliter l'installation des semis, la solution contaminatrice fut préparée en mélangeant les suspensions issues de :

- une culture à la concentration favorisant la formation des périthèces,
- une culture à la concentration favorisant les deux types de fructification,
- une culture à la concentration favorisant la formation des têtes conidiennes.

Les groupes de tubes de saccharose et glucose de chaque concentration furent répartis dans les conditions suivantes :

- | | | |
|---------|---|---------------------------------------|
| 33° | } | étuves très humides, lumière du jour, |
| 27° | | |
| 18° | | |
| 9 à 11° | | humidité faible, lumière du jour, |
| 5 à 6° | | armoire frigorifique à l'obscurité. |

Afin de ralentir les échanges de températures dans les deux dernières enceintes, les seaux de verre contenant les tubes furent remplis d'eau.

a) En quelques jours la plupart des cultures placées à 18 et à 27° poussaient suivies par celles à 33° alors que un mois fut nécessaire au démarrage des premiers tubes cultivés à 9-11° et cinq semaines pour que quelques subtiles efflorescences soient discernables entre 5 et 6°.

b) Nous ne pouvons pas donner la fastidieuse description des caractères cultureux ni les résultats des multiples examens microscopiques qui se sont étalés sur près de deux mois d'observations. Disons seulement que la variation des caractères morphologiques des têtes conidiennes et des productions de pigments sont comparables à celles décrites par MANGIN (1908) et VUILLEMIN (1920) (fig. 1).

c) A 27°, les résultats obtenus avec le saccharose pur sont comparables à ceux obtenus avec le sucre de betterave, la croissance est possible sur toutes les concentrations et les observations ne sont limitées que par la cristallisation spontanée des solutions ; mais avec le glucose pur la limite supérieure de croissance atteint 1 400 g au bout de deux semaines alors qu'elle est supérieure à 2 000 g dans le même temps avec le glucose Massé. Ainsi se trouve éliminée l'opinion que le barrage du glucose Massé était dû à des impuretés ; son analyse révèle de 65 à 75 % de glucose pur, des dextrines et de 18 à 25 % d'eau selon les fabrications ; c'est donc en fait un glucose « dilué ». La limite supérieure de croissance apparaît liée directement au glucose.

Dans les deux sucres il y a décalage entre la concentration assurant la meilleure production de périthèces et celle de têtes conidiennes (graph. 1) et, si l'examen microscopique révèle la présence de quelques têtes conidiennes aux concentrations les plus faibles, elles sont très aberrantes, petites, incolores ou imprégnées des pigments périthéciaux en pinceaux pénicilliens, les phialides proliférant souvent (fig. 1 e). Les concentrations élevées sont incompatibles avec la présence même d'ébauches périthéciales.

Malgré plusieurs tentatives, nous n'avons pu comparer numériquement la production des périthèces et celle des têtes conidiennes ; voici l'échelle que nous avons constituée :

très rares	{	quelques formations ascogoniales
rare		quelques têtes conidiennes très anormales
rare	{	ébauches périthéciales stériles
présents .		têtes conidiennes toutes anormales
abondants	{	des périthèces adultes
		des têtes conidiennes normales
		périthèces adultes nombreux
	{	têtes conidiennes normales nombreuses

très abon- (production maximale de fructifications
dants) normales

d) Le développement mycélien est meilleur sur saccharose que sur glucose, mais dans les conditions de l'expérience il ne nous était pas possible de faire des mesures pondérales.

Nous avons dressé les courbes de croissance mycélienne pour chaque concentration en fonction de la température (graph. 2).

Les croissances sont ainsi définies :

subtile : quelques filaments mycéliens sur le verre ou flottant dans la solution ;

légère : voile mycélien superficiel ;

moyenne : culture superficielle s'épaississant ;

vigoureuse : stroma superficiel épais ;

très vigoureuse : stroma épais (correspond en général à la zone de meilleure croissance périthéciale).

Toutes les courbes ont été dressées sans tenir compte du temps de croissance propre à chaque condition et qui s'étale sur près de deux mois.

Ces deux familles de courbes montrent un déplacement très net des croissances maximales en fonction de la température et de la concentration, les températures comprises entre 18 et 27° étant dans tous les cas les températures optimales de croissance.

e) Dans les graphiques 3 et 4 nous avons essayé de synthétiser toutes nos observations sur les types de fructifications présentés par l'*Aspergillus Mangini* aux différentes températures. L'examen de ces graphiques montre que, dans les délais de l'expérience, nombreuses sont les concentrations incompatibles avec une croissance normale.

La forme conidienne normale se développe avec des limites extrêmes variables en fonction de la température.

La forme périthéciale a des exigences thermiques plus strictes correspondant aux températures de croissance optimale.

Le barrage du glucose. Calcul des pressions osmotiques.

La différence de comportement de l'*Aspergillus Mangini* sur solutions de glucose et saccharose nous a fait penser au rôle possible joué par la pression osmotique. A des concentrations aussi élevées la loi de Van't Hoff n'est plus applicable mais MORSE et ses collaborateurs (1), étudiant la pression osmotique de

(1) Qu'il nous soit ici permis de remercier notre ami M. Ploquin, professeur agrégé à la Faculté de Pharmacie de Nantes, qui nous a fourni ces documents bibliographiques indispensables.

solutions très concentrées de glucose et de saccharose, pensent pouvoir admettre que « le corps dissous exerce une pression osmotique égale à la pression exercée à la même température par la quantité moléculairement équivalente d'un gaz dont le volume serait réduit au volume du solvant à l'état pur ». Dans la formule qu'ils proposent :

$$p'' = (22,265 + 0,0817 \theta) \gamma'_m \times 10^3,$$

γ'_m = nombre de molécules grammes du corps dissous introduits dans 1 g d'eau,
 θ = température en degrés centigrades,
 p'' = pression osmotique à la température θ exprimée en atmosphères.

Grâce à cette formule nous avons calculé les pressions osmotiques des solutions permettant les croisances limites de l'*Aspergillus Mangini* aux diverses températures : pour le glucose (G) et le saccharose (S) les concentrations relatives étant indiquées en indices.

*Pressions osmotiques
 autorisant les limites extrêmes de croissance.*

5° : G200 à G600	25 à 75	atm.
S400 à S1200	26 à 79	—
10° : G<100 à G1000	< 12 à 127	—
S100 à S 1800	7 à 121	—
18° : G<100 à G1600	< 13 à 209	—
S<100 à S>3000	< 7 à > 206	— (1)
27° : G<100 à G1800	13,5 à 242	—
S<100 à S>3000	< 7 à > 206	— (1)
33° : G200 à G1400	27,5 à 192,5	—
S200 à S2600	14,5 à 188,5	—

Aux erreurs d'évaluation près, il est intéressant de constater que pour une même température, les pressions osmotiques des solutions autorisant les croisances limites sont semblables. Quand la température correspond à l'optimum thermique, les pressions supportées ont la plus grande marge de variation alors que, aux températures basses, la limite est faible !

On pressent tout l'intérêt que ces observations peuvent avoir quant à la conservation des pruneaux ; un pruneau est essentiellement un support à pression osmotique élevée ; celle-ci variant d'ailleurs en raison inverse de la teneur en eau des fruits. Si donc notre observation est applicable aux pruneaux, l'*Aspergillus Mangini*, capable de détruire des fruits commerciaux

(1) La recristallisation ne permet pas d'évaluer plus haut mais la présence d'ébauches périthéciales à 2 600 permet de croire que la croissance peut dépasser 3 000 g de saccharose par litre

à température ordinaire, sera dans l'impossibilité de se développer dès que les fruits seront entreposés à des températures plus basses.

Nous avons calculé par ailleurs les limites de croissance et celles de relative abondance des têtes conidiennes normales ; les données sont différentes alors entre le glucose et le saccharose mais il n'y a rien là d'extraordinaire puisque ce dernier sucre doit être hydrolysé et que ce sont des systèmes enzymatiques très différents qui interviennent.

Deux familles de courbes ont été dressées qui définissent l'aire de croissance de l'*Aspergillus Mangini* en fonction de la température et des concentrations exprimées en atmosphères ; la régularité de ces courbes rend possible des extrapolations (graph. 5 et 6).

Rôle du froid et de la chaleur sur le comportement ultérieur de l'*Aspergillus Mangini* en culture.

Après avoir jugé du rôle de la température sur la croissance de l'*Aspergillus Mangini*, nous avons décidé de maintenir deux semaines tous les tubes à la température du laboratoire (20° environ).

Dès observations faites à nouveau sur chacun d'entre eux permettent de préciser les faits suivants :

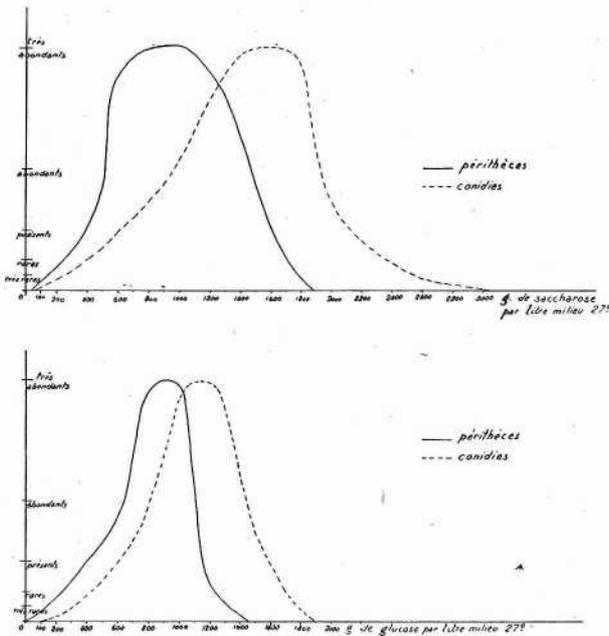
1) Les séries cultivées primitivement à 18 et 27° avaient pour la plupart achevé leur croissance sauf celles à 100 g de glucose, 100 et 200 g de saccharose très en retard et qui continuent à évoluer lentement.

2) A 33°, les semis à faible concentration n'avaient pas germé ou avaient faiblement démarré : ils germent et se développent en prenant les caractères culturaux d'une culture à 20° sur la même solution. La chaleur a donc différé la germination aux faibles concentrations. Les cultures qui avaient très mal poussé et les tubes restés stériles aux concentrations très élevées n'ont pas modifié leur état ; la chaleur a définitivement empêché la croissance.

3) A 5 et 10°, seules germent et se développent, en prenant les caractères culturaux propres à leur nouvelle température, les cultures faites sur des concentrations de saccharose inférieures à 1 800 g, de glucose inférieures à 1 200 g à 10° et 1 000 g à 5°.

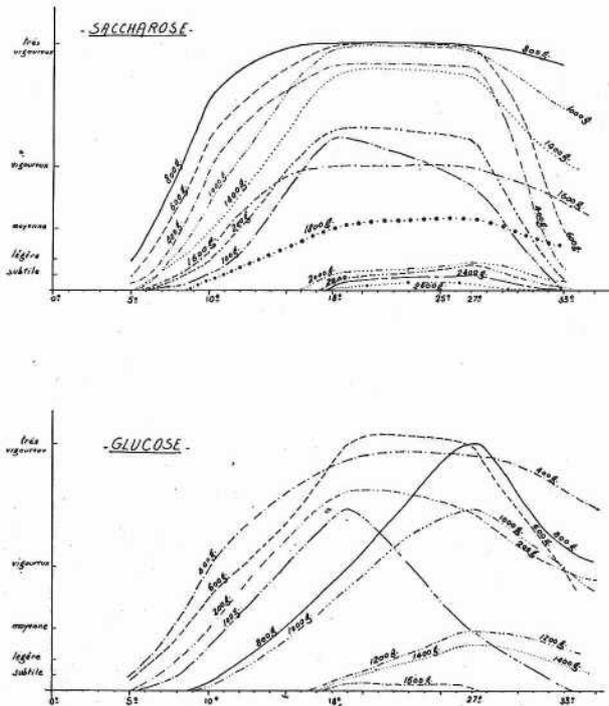
Ainsi, les températures basses et élevées sont-elles pour les faibles concentrations un barrage momentané à la germination ou la croissance ; dès que les conditions optimales sont réalisées, la germination et la croissance deviennent normales.

Aux concentrations élevées, les mauvaises croisances, les absences de germination sont irréversibles, la souche n'a pu s'adapter, elle a végété ou les spores sont tuées.



GRAPHIQUE 1. — Production des périthèces (en traits pleins) et des têtes conidiennes (en tirets) de l'*Aspergillus Mangini* en fonction de la concentration du milieu de culture en glucides (saccharose pour le graphique d'en haut; glucose pour le graphique d'en bas). Cultures maintenues à 27°. (Pour l'échelle des ordonnées, voir explication dans le texte.)

GRAPHIQUE 2. — Croissance mycélienne de l'*Aspergillus Mangini* pour chaque concentration du milieu en glucides (saccharose en haut, glucose en bas) en fonction de la température. (Pour l'échelle des ordonnées, voir explication dans le texte.)



Cette irréversibilité du phénomène est intéressante puisque un séjour prolongé à 5° sur des concentrations de 1 000 g et plus de glucose est incompatible avec la survie des spores.

Évaluation de la richesse en sucres des pruneaux.

Plusieurs échantillons de pruneaux ont été analysés afin de connaître la quantité de sucres et leur nature en fonction du stade de fabrication. Il ne nous appartient pas de donner le détail de toutes ces analyses (1) mais nous citerons toutefois un exemple : celui d'un lot de pruneaux sains, n'ayant subi ni ébullantage ni étuvage.

100 g de pulpe de ces pruneaux contiennent 57,8 % de matières sèches — dont 39,44 % de sucres réducteurs (22,48 % de glucose ; 16,96 % de fructose) et 3,43 % de saccharose.

Autres sucres : néant ; glucides totaux : 74,14 % du poids sec.

Ainsi la pulpe de ces pruneaux pour 42 g d'eau contient 39,5 g de sucres en C₆, 3,5 g de sucres en C₁₂. Un calcul rapide nous montre que, pour 1 000 g d'eau, ceci équivaut à 940 g de sucres réducteurs et 83 g de saccharose. Comme le saccharose a une pression osmotique à peu près égale à la moitié de celle du glucose, ceci revient à assimiler la pulpe des pruneaux à un milieu de culture qui contiendrait sensiblement 1 000 g de glucose par litre de solution.

Nous reportant aux graphiques 4 et 6 nous constatons qu'à l'optimum de température, cette concentration en culture artificielle est à la limite de la formation des périthèces mais à l'optimum de celle des têtes conidiennes ; si par contre nous amenions ces pruneaux à 10°, la croissance du parasite serait à peine possible et à 5° impossible. Or l'analyse de ce même lot de pruneaux effectuée par un laboratoire de chimie industrielle leur reconnaît 24 % d'humidité relative, ce sont des pruneaux trop secs pour la consommation.

On peut prévoir dès lors que les pruneaux commerciaux ayant quelques degrés d'humidité en plus se maintiendront eux aussi dans la zone dangereuse, s'ils sont conservés à température normale.

Le pourcentage d'humidité des pruneaux.

Les résultats obtenus par un laboratoire d'analyse montrent la grande variabilité du taux d'humidité des

(1) Nous remercions M^{lle} Cholet, professeur à la Faculté libre des Sciences de Lille, qui nous a communiqué ces résultats et avec laquelle nous collaborons pour faire l'étude de la dégradation des sucres par l'*Aspergillus Mangini*.

pruneaux tant au cours de la fabrication qu'au cours de la conservation.

A la sortie du tunnel de séchage, selon les lots, l'humidité relative variait cette année de 24 à 29 % ; durant les trois premières semaines, l'entreposage dans un hangar leur faisait perdre de 2 à 4 % d'humidité récupérés lors de la dernière semaine (ceci montre l'extrême hygroscopie de ces fruits, très sensibles aux variations atmosphériques), l'ébouillantage les amène à leur pourcentage commercial : entre 31 et 34 %. Ce n'est d'ailleurs qu'une confirmation de ce que R. ULRICH et M^{me} J. LAFOND (1948) ont étudié avec précision. Ils ont établi que « la captation (ou la perte) d'eau est beaucoup plus rapide à 30° qu'à 20° et surtout qu'à 10°. Le coefficient de température est voisin de 3 entre 10 et 30° ».

D'après leurs travaux : à 10°, une humidité atmosphérique relative de 57 % laisse en équilibre des pruneaux à 34 % d'humidité relative (humidité optimale vis-à-vis des qualités organoleptiques) alors qu'à 30°, une humidité atmosphérique relative de 52 % est en équilibre avec des pruneaux à 26 % (pruneaux secs).

Étude expérimentale de l'infection des pruneaux et du processus de contagion.

L'*Aspergillus Mangini* se développant bien à 27°, c'est à cette température que nous avons fait les premiers essais.

1) Infection par semis de spores.

Des pruneaux d'un même lot sont placés par 3 ou 4 dans des boîtes de Pétri. A l'aide d'une aiguille à ensemençer, plusieurs amas de périthèces adultes sont déposés à leur surface. Certaines boîtes sont ainsi rangées dans l'étuve, d'autres reçoivent avant l'incubation un tampon de coton hydrophile imbibé d'eau, à distance variable des pruneaux.

L'expérience montre que :

a) selon l'état hygrométrique des pruneaux et celui de l'étuve, l'infection se produit ou non dans les boîtes de Pétri sans coton hydrophile ;

b) quels que soient l'état hygrométrique des pruneaux et celui de l'étuve, en présence de coton hydrophile humide, l'infection se produit toujours rapidement à condition que les pruneaux ne soient ni au contact direct du tampon (ils sont alors trop humides et ce sont des moisissures banales qui se développent) ni à très grande distance (ils restent alors très secs).

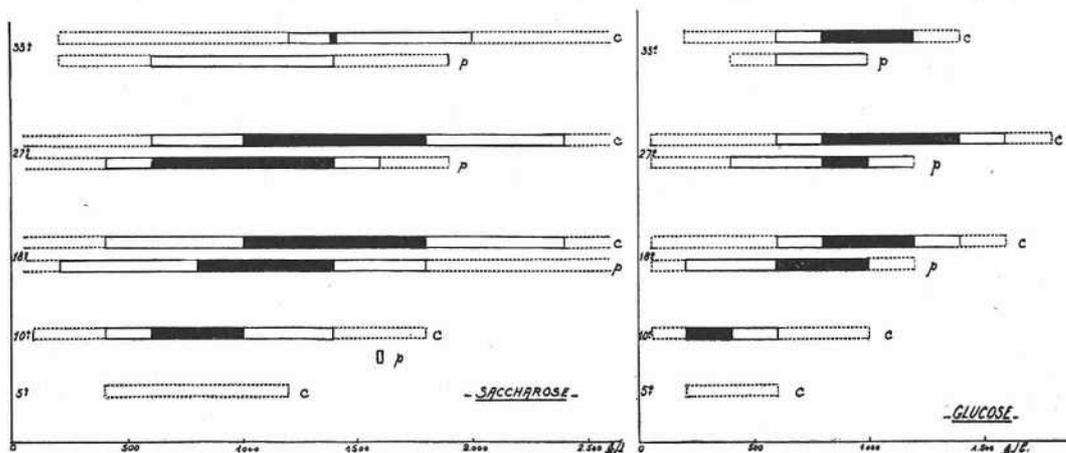
Le gradient d'humidité sur le pruneau est tel que c'est toujours le semis situé sur la partie la plus proche du coton qui démarre le premier ; le départ de l'infection étant indépendant en tous les cas de l'orientation du pruneau vis-à-vis de la source humide (extrémité pédonculaire ou distale, point latéral quelconque). L'infection est d'autant plus rapide que les pruneaux proviennent d'un lot plus humide.

GRAPHIQUE 3. — Type de fructifications de l'*Aspergillus Mangini* en fonction de la concentration du milieu en saccharose et de la température.

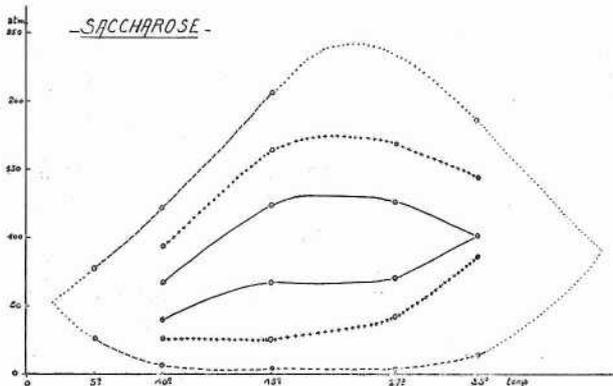
c = têtes conidiennes p = périthèces.

en pointillés : têtes conidiennes aberrantes, ébauches périthéciales. (Lorsque les concentrations autorisant la croissance sont inférieures à 100 g par litre ou qu'elles sortent des limites du graphique l'arrêt des courbes est laissé imprécis).
 en traits pleins : conidies normales, périthèces adultes.
 en noir : zone de plus grande fructification pour la température donnée.

GRAPHIQUE 4. — Types de fructifications de l'*Aspergillus Mangini* en fonction de la concentration du milieu en glucose et de la température. (Mêmes signes conventionnels que dans le graphique 3.)



Nous voulions savoir si un apport local d'eau pouvait favoriser la germination. Des gouttelettes furent déposées au niveau de chacun des points d'infection de pruneaux placés en incubation sans tampon d'ouate ; au bout de 4 jours aucune colonie ne s'est installée alors que l'eau est disparue ; cet apport s'est révélé insuffisant pour modifier l'état de réceptivité du pruneau.



GRAPHIQUE 5. — Aire de croissance de l'*Aspergillus Mangini* en fonction de la température et de la pression osmotique de la solution de saccharose exprimée en atmosphères ;
 en tirets : limite extrême de croissance mycélienne ;
 en croix : limite extrême de formation de têtes conidiennes normales ;
 en traits pleins : limite de relative abondance des têtes conidiennes ;
 en pointillés : tracé supposé de la courbe en fonction des points connus ;

La concentration de 1 000 g correspond à : 5° : 65 atm. ; 10° : 67 atm. ; 18° : 68 atm. ; 27° : 71 atm. ; 33° : 72 atm.

Ainsi, l'infection par semis de spores ne se réalise-t-elle sur pruneau, quel que soit son stade de fabrication, que s'il atteint la consistance requise pour que la germination se produise.

2) Infection par mycélium.

Nous avons essayé de préciser les conditions de formation des « nids » de fruits moisés.

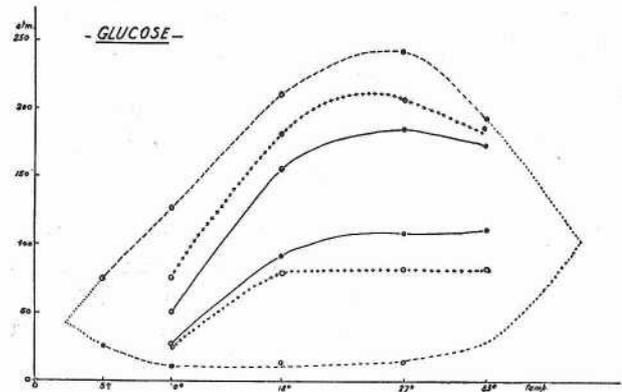
En effet, on conçoit bien que, l'*Aspergillus Mangini* étant endémique, dans les locaux de fabrication des spores tombent sur quelques pruneaux et, comme les lots ne sont pas homogènes, les pruneaux les plus humides s'infectent mais comment expliquer alors une rapide évolution de la maladie ?

Dans des boîtes de Pétri, nous avons placé des pruneaux commerciaux sains au contact de pruneaux moisés, en étuve à 27°, 80 % d'humidité relative. L'expérience montre que l'état d'évolution de la colonie contaminatrice est très important :

a) le contact est établi au niveau des têtes conidiennes (pruneaux moisés depuis longtemps ou centre

de colonies jeunes) : l'infection n'est possible que grâce à l'apport d'humidité supplémentaire du tampon d'ouate (nous sommes ramenés aux conditions nécessaires à la germination des spores) ;

b) le contact est établi au niveau du feutrage blanc épais, dans sa « phase linéaire de croissance » : la contamination est très rapide et sans apport d'humidité extérieure.



GRAPHIQUE 6. — Aire de croissance de l'*Aspergillus Mangini* en fonction de la température et de la pression osmotique de la solution de glucose. (Mêmes signes conventionnels que dans le graphique 5.) La concentration de 1 000 g correspond à : 5° : 124 atm. ; 10° : 127 atm. ; 18° : 130 atm. ; 27° : 134 atm. ; 33° : 137 atm.

Pensant que l'humidité relative de 80 % était trop élevée, nous avons fait des essais à 27° et 30 % d'humidité relative ; malgré cet air sec, en 4 jours le mycélium s'était installé sur les pruneaux sains.

Si donc l'installation d'une colonie dès la spore présente quelques exigences, un simple contact assure le passage du mycélium non fructifié sur pruneaux commerciaux. Vis-à-vis d'un lot donné, un pruneau peut être ou non contaminateur selon l'état de vigueur de sa colonie propre.

Afin de préciser les limites de contagion, nous étant constitué une collection de pruneaux aux humidités relatives s'échelonnant de 20 à 33 %, nous avons disposé plusieurs pruneaux de chaque lot en boîtes de Pétri.

Le premier groupe de boîtes fut placé en étuve à 27°, 80 % d'humidité relative, les pruneaux étant en contact avec un pruneau dont l'*Aspergillus* est adulte ; après une semaine les échantillons dont l'humidité relative est inférieure à 29 % présentent des contaminations très localisées et c'est l'échantillon à 33 % qui montre seul une belle infection.

Le second groupe de boîtes fut placé à 27° mais 38 % d'humidité relative ; les pruneaux contaminateurs

PHOTO. 4. — Têtes conidiennes de l'*Aspergillus Mangini* vues au microscope. (Cliché Claude Moreau.)

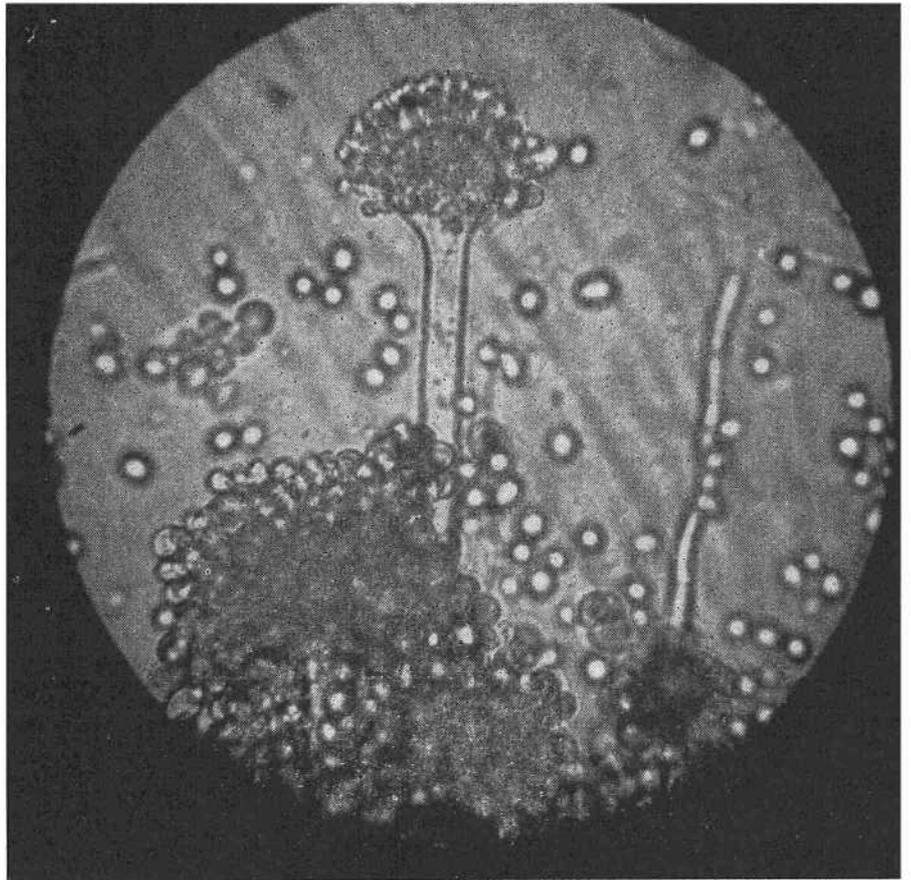


FIG. 1. — *Aspergillus Mangini* (Mangin) Thom et Raper.

a) tête conidienne normale (sur milieu de Czapek à 1 200 g de glucose par litre et à 33°); b) réduction du nombre des phialides (sur milieu à 2600 g de saccharose et à 33°); c) tête conidienne non renflée à 2 phialides (sur milieu à 2000 g de saccharose et à 27°); d) filament mycélien terminé par une seule phialide portant des conidies de tailles variées (sur milieu à 800 g de glucose et à 33°); e) prolifération anarchique de phialides (sur milieu à 400 g de glucose et à 33°); f) tête conidienne à phialides très renflées, pauvres en spores, typique de l'évolution sur un milieu concentré (sur milieu à 1200 g de glucose et à 18°); g) phialide isolée portée directement sur le mycélium (sur milieu à 200 g de saccharose et à 27°); h) formations conidiennes aberrantes sur milieu pauvre en sucres (sur milieu à 200 g de saccharose et à 18°); i) phialides anormales portées sur un gros filament mycélien (sur milieu à 1600 g de saccharose et à 11°); k) chaîne de conidies très allongées (sur milieu à 800 g de glucose et à 18°); l) un asque.

portant des colonies dans leur « phase linéaire de croissance ». Dans ce cas trois jours ont suffi pour que des lots ayant un pourcentage d'humidité relative de 27 à 28 % (pruneaux commercialement trop secs) soient contaminés.

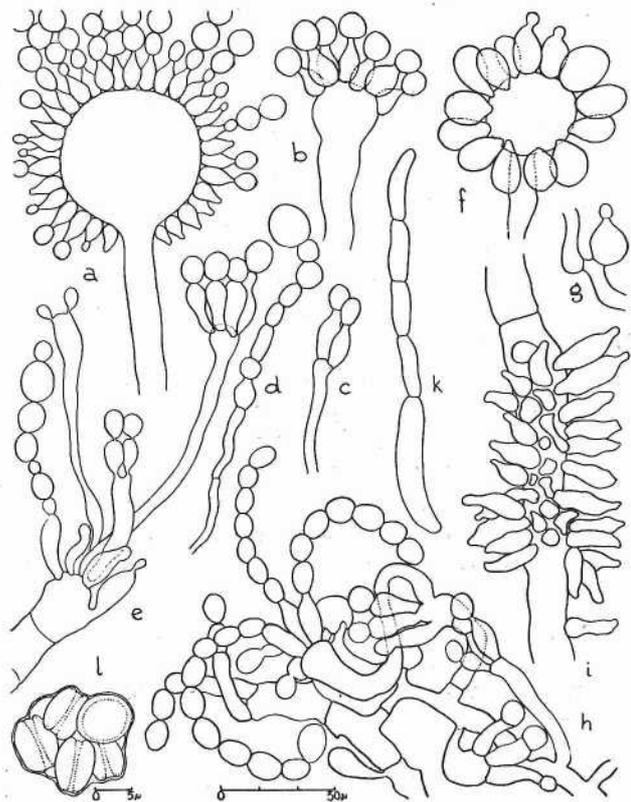
Cet essai montre la difficulté qu'il y a, à la température ordinaire, pour éviter la contagion dans un lot de pruneaux commerciaux.

Développement de l'*Aspergillus Mangini* sur pruneaux en fonction du degré hygrométrique et de la température.

Ayant établi, en culture, le rôle que jouait la température sur la croissance du parasite, il convenait de voir si les résultats obtenus pouvaient s'adapter aux pruneaux.

Les cinq enceintes suivantes sont utilisées pour cette nouvelle série d'essais :

- A. Étuve à 33°, 5 % d'humidité relative, lumière du jour.
- B. Étuve à 27°, 70 à 80 % d'humidité relative, lumière du jour.
- C. Local à 19°, 35 % d'humidité relative, obscurité.
- D. Armoire frigorifique à 9°.
- E. Armoire frigorifique à 6°.



Pour éviter les brusques changements de température, dans les conditions D et E, les boîtes de Pétri sont déposées dans un récipient clos, lui-même placé dans l'eau ; on réalise ainsi autour des pruneaux une atmosphère saturée et confinée.

1^{er} Essai :

Les pruneaux utilisés sont à 30-31 % d'humidité et sont placés avec un tampon d'ouate humide ; au début de l'expérience ces pruneaux sont présumés sains.

après 5 jours :

tous les pruneaux sont sains ;

après 8 jours :

B : départ de l'infection

après 12 jours :

A : les cotons sont secs, l'un des pruneaux est très infecté, l'autre s'est desséché ;

B : tous les pruneaux sont contaminés, têtes conidiennes très abondantes, apparition des périthèces (photo 3) ;

après 20 jours :

C : les pruneaux présentent un petit point d'infection ;

après 40 jours :

C : contamination complète quoique les cotons soient secs depuis longtemps ;

D : l'atmosphère est saturée, les pruneaux sont comme cuits tant ils sont gorgés d'eau, l'infection démarre sur l'un d'eux ;

E : atmosphère saturée, pruneaux gorgés d'eau, l'infection démarre sur l'un d'eux.

Un pruneau présumé sain peut à tout moment s'infecter si le jeu de la température et de l'humidité permet la germination et la croissance des spores présentes à sa surface ; il faut cinq fois plus de temps à 9° qu'à 27° et tandis qu'à 19° le petit apport d'humidité initial a suffi pour induire l'infection, les pruneaux à 6° et 9° commencent à s'infecter alors que leur gonflement est maximum, c'est-à-dire lorsque leur concentration en sucres est très inférieure à la normale (ce qui correspond aux observations faites en culture).

2^e Essai :

Pruneaux à 30-31 % d'humidité, placés avec un tampon d'ouate humide en début d'expérience ; infection expérimentale et massive par périthèces et conidies.

après 5 jours :

A et B : bon développement de l'*Aspergillus* ;

C : départ des semis ;

après 12 jours :

A : les cotons sont desséchés, le mycélium a été arrêté dans son développement ;

B : infection totale, périthèces très nombreux ;

C : infection légèrement en retard sur B ;

D : germination des semis.

après 20 jours :

C : le mycélium entoure les pruneaux d'un feutrage épais de 1 cm ; têtes conidiennes et périthèces très nombreux. Il semble que les conditions de croissance soient optimales ;

D : les colonies ont 1 cm de diamètre ;

après 40 jours :

D : les pruneaux ruissellent d'humidité, le mycélium qui les recouvre porte des têtes conidiennes ;

E : les pruneaux sont gorgés d'eau ; les semis démarrent lentement ; ils portent quelques têtes conidiennes incolores dont les conidies sont anormales.

L'infection par un semis en masse peut se réaliser rapidement si l'humidité est suffisante. Une atmosphère très sèche (5 %) stoppe à 33° l'infection qui peut reprendre dès le retour à un taux normal d'humidité.

Une humidité de 35 % mais à la température de 19° ne déshydrate pas trop vite les pruneaux et permet un développement très harmonieux du parasite ; il faut une atmosphère sursaturée pour que l'infection soit possible aux basses températures.

Le semis démarre en 2 jours à 27 et 33°, en 5 jours à 19°, en 12 jours à 9° et en 30 jours à 6°.

Le cycle du champignon est bouclé en 12 jours dans les deux premières enceintes ; en 20 jours à 19° ; 40 jours ne permettent que le développement des conidies à 9° et sont insuffisants pour leur développement normal à 6°.

Ces résultats confirment ceux obtenus en culture artificielle.

3^e Essai :

Contamination par contact de pruneaux dont le mycélium est dans la « phase linéaire de croissance ».

Les pruneaux à contaminer appartiennent aux quatre lots suivants :

lot 1 : 28 à 30 % d'humidité relative

lot 2 : 30-33 % — —

lot 3 : 33-36 % d'humidité relative
lot 4 : 34-39 % — —

Aucun tampon d'ouate n'est placé dans les boîtes.

après 7 jours :

- A : le mycélium contaminateur est partout stoppé dans sa croissance ; tous les pruneaux sont très secs ; les lots 1 et 4 reçoivent alors un tampon d'ouate humide ;
B : lot 1 : le mycélium s'installe peu ; alors que le lot 4 a ses pruneaux aux 2/3 envahis avec de nombreuses têtes conidiennes ;
C : les lots 1 et 2 peu contaminés, 3 et 4 le sont plus ;
D et E : les pruneaux contaminateurs, sous choc physiologique, sporulent abondamment mais n'infectent pas les pruneaux sains ;

après 15 jours :

- A : alors que dans les lots 2 et 3 même les pruneaux contaminateurs sont complètement desséchés, les lots 1 et 4, qui ont reçu un appoint d'humidité, sont infectés, le 4 étant le plus atteint ;
C : lot 1 : la colonie mycélienne atteint 1 cm de diamètre tandis que les autres lots ont leurs fruits envahis progressivement jusqu'au tiers de leur surface ;
D et E : le mycélium contaminateur garde son

bel aspect ouaté mais ne s'installe sur aucun des lots ;

après 35 jours :

- C : l'infection du lot 1 n'a que peu progressé, celle des numéros 2 et 3 atteint la moitié de la surface ; celle du numéro 4 occupe les 3/4 de la surface des pruneaux ;
D : l'infection s'installe sur les lots 1 et 2, les lots 3 et 4 ont le 1/3 de leur surface envahie ; quelques têtes conidiennes se forment mais l'eau ruisselle dans les boîtes ;
E : l'infection s'installe sur les lots 1 et 2, les autres sont envahis au 1/4 de leur surface ; l'eau ruisselle dans les boîtes.

a) *Même à une température favorable à sa croissance, l'Aspergillus ne peut se développer si l'humidité ambiante est pratiquement nulle ; quelle que soit l'humidité des pruneaux à l'origine ceux-ci se déshydratent très vite.*

b) *Pour une humidité ambiante et une température données, l'humidité relative des pruneaux est un facteur favorisant ou non la contagion ; ainsi dans l'enceinte B : à 28-30 % le mycélium est tellement vigoureux qu'il sort des boîtes.*

c) *L'infection des pruneaux par le mycélium en phase linéaire de croissance se montre toujours plus rapide et plus facile que l'infection par spores, même en masse.*

d) *La seule température dans tous les cas reste un facteur limitant de la croissance quelles que soient les autres conditions.*

CONCLUSIONS

D'un apport de faits aussi variés, nous nous devons de tirer des conclusions théoriques et pratiques.

L'étude expérimentale de la nutrition carbonée de l'Aspergillus Mangini permet de confirmer et préciser les travaux de Klebs ; ce Champignon est gros consommateur de sucres : les exigences de ses deux formes de fructification sont en déphasage ; il supporte des concentrations de saccharose si élevées que les expériences sont gênées par la cristallisation spontanée des solutions, il est moins tolérant vis-à-vis du glucose.

La pression osmotique des solutions apparaît alors comme le facteur limitant la croissance ; la tolérance du Champignon à son égard étant d'ailleurs fonction de la température.

Le pruneau commercial (30 à 35 % d'humidité relative) assimilé à son rapport $\frac{\text{sucres}}{\text{eau}}$ est très favorable à l'Aspergillus Mangini ; en fait, les nombreux examens de pruneaux moisissés, l'étude expérimentale de l'infection et de la contamination, nous ont montré que trois facteurs sont responsables du développement de la moisissure verte ; ce sont :

*l'humidité relative des fruits,
celle de l'air ambiant,
la température d'entreposage,*

mais ces trois facteurs sont étroitement dépendants ; or, le premier ne peut être anormalement modifié ; enlever au pruneau les unités d'humidité relative rendant impossible la germination et la croissance du parasite, c'est lui faire perdre à la

fois un poids important et surtout ses qualités organoleptiques; abaisser très fortement l'humidité relative de l'air ambiant, c'est peut-être gêner la germination et ralentir la contamination mais c'est surtout très appréciablement déshydrater les fruits; dès 1948, R. Ulrich et M^{me} J. Lafond ont montré l'intérêt des basses températures (10°) dans le ralentissement des échanges d'eau entre les pruneaux et l'atmosphère: comme entre 30° et 10° le coefficient est voisin de 3, une humidité atmosphérique relativement basse devient alors compatible avec la conservation du pruneau marchand; si déjà l'abaissement du taux d'humidité ambiant nuit au bon développement du parasite, nous avons montré que les basses températures rendent pratiquement impossible la croissance de l'*Aspergillus Mangini* sur de hautes concentrations de sucres, donc sur le pruneau commercial s'il n'y a pas d'apport d'eau extérieur.

Considérant que: l'*Aspergillus Mangini* est endémique dans les locaux de fabrication; les fautes de séchage, les fluctuations atmosphériques peuvent assurer les conditions favorables à la germination des spores; la contagion de proche en proche est très facile entre 20 et 25°; la plupart des traitements chimiques directs sont à exclure parce qu'inefficaces ou dangereux; une authentique stérilisation des pruneaux par autoclavage est incompatible avec la conservation de leurs qualités organoleptiques (caramélisation des sucres) et n'est pas sans danger pour les types d'emballages adoptés. Par des voies différentes et pour des motifs différents des leurs, nous pensons qu'il est logique de recommander avec R. Ulrich et M^{me} J. Lafond (1948) l'entreposage des pruneaux, dès la sortie du tunnel de séchage et jusqu'à la vente, en chambre froide, à humidité relative contrôlée.

(Laboratoire de Cryptogamie,
Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris).

BIBLIOGRAPHIE

- HEINTZELER (J.). — Das Wachstum Schimmelpilze in Abhängigkeit von den Hydraturverhältnissen unter verschiedenen Aussenbedingungen. *Arch. Mikrobiol.*, t. X, fasc. I, p. 92-132, 1939.
- KLEBS (G.). — Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen. 543 p., Jéna, 1896.
- MANGIN (L.). — Sur la nécessité de préciser les diagnoses des Moisissures. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, t. LV, p. xvii-xxviii, pl. 1, 1908.
- MANGIN (L.). — Qu'est-ce que l'*Aspergillus glaucus*? Étude critique et expérimentale des formes groupées sous ce nom. *Ann. Sc. Nat.*, 9^e sér., Bot., t. X, p. 103-172, 1909.
- VON SCHELHORN (M.). — Untersuchungen über den Verderb wasserarmer Lebensmittel durch osmophile Mikroorganismen. I. Verderb von Lebensmittel durch osmophile Hefen. II. Grenzkonzentrationen für den osmophilen Schimmelpilz *Aspergillus glaucus* in Abhängigkeit vom pH Wert des Substrates. *Z. Lebensmitt. Unters. u. Forsch.*, t. XCI, fasc. 1, p. 117-124, 338-342, 1950.
- SCURTI (J.). — Sulle variazioni che l'apparato conidico di alcuni *Aspergilli* subisce in substrati differenti. *Ann. Sper. agr.*, N. S., t. II, fasc. 1, p. 101-106, 1948.
- STILLE (B.). — Der mikrobielle Verderbgetrockneter Lebensmittel in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit. *Vor. Pfl. Lebensm.-Forsch.*, t. V, p. 403-408, 1942.
- STILLE (B.). — Die Sporenkeimung von *Aspergillus glaucus* in Abhängigkeit von Temperatur und Luftfeuchtigkeit. *Archiv f. Mikrobiologie*, t. XIV, p. 108-112, 1948.
- THOM (C.) et RAPER (K. B.). — A manual of the *Aspergilli*. 373 p., Baltimore, 1945.
- ULRICH (R.) et LAFOND (J.). — La déshydratation et la réhydratation des pruneaux en atmosphères plus ou moins humides. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, t. XXXIV, fasc. 4, p. 206-207, 1948.
- VUILLEMIN (P.). — Nouvelles souches thermophiles d'*Aspergillus glaucus*. *Bull. Soc. Myc. Fr.*, t. XXXVI, p. 127-136, 3 fig., 1920.

CONTRE LA MOISSURE
DES AGRUMES

SUPER-PENTABOR N

— SANS DANGER —

S. A. BORAX FRANÇAIS

64, rue des Mathurins, PARIS 8^e

ET DROGUERIES D'AFRIQUE DU NORD

Agences Maritimes

Henry LESAGE

Siège social : 7, Cité Paradis, PARIS

Succursales : DUNKERQUE, LE HAVRE, NANTES
BORDEAUX, MARSEILLE, ANVERS, GAND, CONAKRY

EXPÉDITIONS — ASSURANCES — CONSIGNATION
TRANSPORTS de FRUITS par NAVIRES SPÉCIALISÉS