Etude comparée de *Penicillium roqueforti* et *P. verrucosum* var. *cyclopium*

par

P. VEAU*, R. A. SAMSON** et A. BRETON*

INTRODUCTION

Tous les fromages à pâte persillée (fromages bleus), tels que fromage de Roquefort, fourme d'Ambert, bleu d'Auvergne, et autres, impliquent dans leur fabrication des souches de *Penicillium roqueforti*. De nos jours les fromagers achètent ce levain fongique sous forme de spores qu'ils incorporent au lait de fabrication. La production industrielle des spores de *P. roqueforti* nécessite l'emploi de cultures pures. Parmi les contaminants éventuels de ce levain on trouve *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* morphologiquement voisin de *P. roqueforti* avec lequel il peut être confondu. Ce champignon dégage une forte odeur de terre mouillée, donne un goût amer et piquant aux fromages infectés dans la masse et produit de nombreuses toxines, certaines neurotoxiques et néphrotoxiques [3].

Bien que *P. roqueforti* et *P. verrucosum* var. *cyclopium* aient fait l'objet de nombreux travaux [6, 7], il nous est apparu nécessaire d'établir une comparaison entre ces deux champignons basée sur leurs caractères morphologiques et culturels, et d'étudier leur comportement vis-à-vis de l'oxygène et du gaz carbonique, *P. roqueforti* colonisant des milieux à fort degré d'anaérobiose tels que fromages, ensilages [5] ou bouchon [4].

MATERIEL ET METHODES

Les souches proviennent de la mycothèque CBS (Baarn, Pays-Bas) ; elles ont été isolées par nous, ou nous ont été aimablement

* Laboratoire de Microbiologie, 4, rue Ledru - 63000 Clermont-Ferrand (France).

** Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn (Pays-Bas).

fig. 1

Conidiophores (G 1000 X)

A. *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* (réduction $\frac{6}{7}$).

B. *Penicillium roqueforti* (réduction $\frac{6}{7}$).

adressées par d'autres laboratoires. Dix-neuf souches de *P. roqueforti*, douze souches de *P. verrucosum* var. *cyclopium*, une souche de *P. aurantiovirens* Biourge, *P. martensii* Biourge et *P. palitans* Westling, tous trois assimilés à *P. verrucosum* var. *cyclopium*, ont été testées.

Les milieux de culture suivants ont été employés :

— milieu au malt : eau distillée (1 000 ml), malt extract Difco (20 g), Bacto agar Difco (15 g). Stérilisation 20 min à 120° C, pH 4,5 ;

fig. 2

Penicillium roqueforti. Structures conidiogènes immergées dans l'agar (G 1000 X).

— milieu de Czapek : eau distillée (1 000 ml), NaNO_3 (3 g), K_2HPO_4 (1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,5 g), KCl (0,5 g), $\text{Fe SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,01 g), saccharose pur (30 g), bacto agar Difco (15 g). Stérilisation 15 min à 110°C ; pH 6,5 ;

— milieu sélectif : sa composition est celle du milieu de Czapek dans lequel le saccharose est remplacé, en gardant la même quantité d'atomes de carbone par litre de milieu, par de l'acétate de sodium hydraté. Stérilisation à 110°C .

La croissance linéaire est mesurée sur des thalles cultivés en boîtes de Pétri, à $25^\circ \text{C} \pm 0,5^\circ \text{C}$, par deux diamètres perpendiculaires, avec cinq répétitions par souche.

L'étude en atmosphère contrôlée a été réalisée, à 25°C , à raison de cinq répétitions par souche, sur cinq isolats de *P. roqueforti* et trois de *P. verrucosum* var. *cyclopium* choisis de façon à couvrir un échantillonnage allant d'une croissance rapide à une croissance lente.

TABLEAU 1

Etude comparée des caractères morphologiques et culturaux de *P. roqueforti* et *P. verrucosum* var. *cyclopium*

	<i>P. roqueforti</i>	<i>P. verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>
Thalle	Fimbrié, non zoné, typiquement velouté, laineux dans les vieilles cultures. Revers verdâtre évoluant vers le noir.	Non fimbrié, parfois zoné, d'aspect granuleux. Revers incolore, jaune, rose, pourpre ou brun-orangé à marron clair, avec parfois des pigments diffusant dans l'agar.
Exsudat	Sous forme de gouttelettes hyalines dans les souches d'isolement récent.	Sous forme de gouttelettes hyalines dans les souches d'isolement récent.
Odeur	Absente.	Très forte de terre mouillée ou de <i>Streptomyces</i> , parfois de pomme plus prononcée sur milieu au malt.
Conidiophores	Isolés, asymétriques, grossièrement granuleux, surtout sur milieu au malt, $100-200 \times 4-6,5 \mu\text{m}$ dans la gélose, réduits et divariqués.	Isolés ou agrégés en faisceaux, asymétriques, finement et densément granuleux surtout sur milieu au malt, $100-400 \times 3,0-4,0 \mu\text{m}$, absents dans la gélose.
Métules	$10-15 \times 3-4,5 \mu\text{m}$.	$10-15 \times 2,5-3,5 \mu\text{m}$.
Phialides	$8-12 \times 3,0-3,5 \mu\text{m}$.	$7,0-9,0 \times 2,0-2,5 \mu\text{m}$.
Conidies	En colonnes peu compactes, globuleuses à sub-globuleuses, lisses, verdâtres, $4-6 \mu\text{m}$ de diamètre parfois jusqu'à $8 \mu\text{m}$.	En chaînes enchevêtrées, globuleuses à sub-globuleuses, lisses, verdâtres, $3,0-4,0 \mu\text{m}$ de diamètre.
Sclérotos	Blancs, mous, $50-100 \mu\text{m}$ de diamètre, souvent formés dans les vieilles cultures.	Absents.

Le mélange gazeux est injecté en caissons étanches, après un vide à -720 mm de Hg, un balayage par un courant d'azote, et un nouveau vide à -720 mm de Hg.

I. Etude morphologique

L'étude morphologique de *P. roqueforti* (fig. 1 et 2) et de *P. verrucosum* var. *cyclopium* (fig. 1) est présentée dans le tableau 1.

P. verrucosum var. *cyclopium* peut présenter de grandes variations en ce qui concerne la vitesse de croissance, la texture et la

couleur du thalle. Certaines souches, se rapportant à *P. martensii*, forment des thalles fortement granuleux, bleu-vert brillant à gris-bleu, avec un revers orange-brun à brunâtre et des pigments qui diffusent dans l'agar. D'autres, assimilées à *P. aurantiovirens* sporulent mal sur milieu au malt et développent un halo rouge-orangé intramatriciel autour du thalle en croissance. Ces formes ne peuvent conserver le rang d'espèce en raison de l'existence de souches à caractères intermédiaires entre elles et *P. verrucosum* var. *cyclopium*. La mise en synonymie de vingt-huit espèces ou variétés de *Penicillium* avec *P. verrucosum* var. *cyclopium* témoigne du polymorphisme de ce champignon [6]. *P. roqueforti* est beaucoup plus constant. Soulignons que cette espèce forme dans la gélose des appareils conidiogènes réduits, ramifiés suivant un mode rappelant celui des *Divaricata*, à ornementation moins prononcée. Les phialides de ces structures sont légèrement plus grandes et de forme moins constante, à conidies en courtes chaînes et de taille généralement plus grande que celles produites par les conidiophores aériens (fig. 2).

II. Etude comparée de la croissance linéaire de *P. roqueforti* et de *P. verrucosum* var. *cyclopium*

Pour les deux espèces, les croissances sont toujours plus rapides sur le milieu complexe au malt que sur le milieu synthétique de Czapek (fig. 3 et 4).

fig. 3

Croissance linéaire moyenne de vingt souches de *P. roqueforti* (R) et de quinze souches de *P. verrucosum* var. *cyclopium* (C), cultivées sur milieu de Czapek à 25° C.

fig. 4

Croissance linéaire moyenne de vingt souches de *P. roqueforti* (R) et de quinze souches de *P. verrucosum* var. *cyclopium* (C), cultivées sur milieu au malt à 25° C.

Pour chaque espèce et sur un milieu donné, la vitesse de croissance varie d'une souche à l'autre. Après 5 j de culture sur milieu au malt, les thalles de *P. roqueforti* atteignent 23 à 55 mm de diamètre suivant la souche et ceux du *P. verrucosum* var. *cyclopium* mesurent de 17 à 28 mm. Les vitesses de croissance linéaire moyennes des deux champignons diffèrent entre elles significativement (fig. 3 et 4).

Sur un milieu de Czapek supplémenté avec de l'acétate de sodium à 68 g/l on note une très forte inhibition de la croissance de *P. roqueforti* alors que *P. verrucosum* var. *cyclopium* se développe bien (cf. tableau 2).

Sur un échantillon de spores de *Penicillium roqueforti* étalé sur milieu à l'acétate à 68 g/l, si un thalle apparaît, il s'agira donc d'une pollution.

III. Etude du développement de *P. roqueforti* et de *P. verrucosum* var. *cyclopium* en atmosphère contrôlée

1. INFLUENCE DE LA TENUEUR EN OXYGÈNE

P. roqueforti et *P. verrucosum* var. *cyclopium* ont été cultivés sur milieu de Czapek sous atmosphère composée d'azote et de 0, 5, 10, 25, 50 ou 100 p. 100 d'oxygène au départ. L'atmosphère des enceintes n'étant pas renouvelée, la composition en gaz évolue au

TABLEAU 2

Comparaison des vitesses de croissance linéaire du thalle et des caractères morphologiques et culturaux des *P. roqueforti* et *P. verrucosum* var. *cyclopium* cultivés à 25° C

		<i>P. roqueforti</i>	<i>P. verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>
Caractères culturaux	Thalle	Fimbrié, velouté, bleu-vert, revers noircissant.	Granuleux, couleur variable, parfois pigment diffusible.
	Sclérotés	Présents dans les vieilles cultures.	Absents.
	Odeur	Nulle.	Très forte.
Caractères morphologiques	Conidiophores	Isolés, larges (4 μ m), grossièrement granuleux.	Fasciculés, étroits (3 μ m), densément et finement granuleux.
	Conidies	Rondes, 4,5 μ m de diamètre.	Rondes, 3,4 μ m de diamètre.
Croissance linéaire diamètre du thalle	Milieu Czapek	Rapide, 30 mm en 5 j (en moyenne).	Lente, 21 mm en 5 j (en moyenne).
	Milieu malté	Rapide, 42 mm en 5 j (en moyenne).	Lente, 25 mm en 5 j (en moyenne).
	Milieu à 68 g/l acétate	Nulle ou très réduite.	12 mm en 5 j.
	Atmosphère 100 p. 100 O ₂	Inhibée.	Indifférente.
	Atmosphère + CO ₂	Stimulée.	Inhibée.

fig. 5

Influence de différentes teneurs de l'atmosphère en oxygène et en gaz carbonique sur la croissance linéaire de *P. roqueforti* et de *P. Verrucosum* var. *cyclopium*.

cours du temps, avec certainement une diminution d'oxygène et une augmentation en gaz carbonique [1].

L'influence de la teneur en oxygène sur la croissance est résumée par la figure 5.

Pour toutes les souches du *P. roqueforti* la croissance linéaire reste sensiblement la même sous atmosphère à 5, 10, 25 et 50 p. 100 d'oxygène, mais on note une forte inhibition à 100 p. 100 d'oxygène.

Pour *P. verrucosum* var. *cyclopium*, la croissance linéaire reste aussi comparable aux taux de 5, 10, 25 et 50 p. 100 d'oxygène, mais contrairement à ce qui a été observé pour *P. roqueforti*, un taux de 100 p. 100 d'O₂ n'entraîne pas d'inhibition. Remarquons que ce champignon cultive très bien à des taux d'oxygène relativement bas (5 p. 100).

La morphologie des deux espèces n'est pas affectée par la teneur en oxygène de l'atmosphère. Toutefois à 0 et 100 p. 100 d'oxygène, la sporulation est pratiquement absente pour *P. roqueforti* et très faible pour *P. verrucosum* var. *cyclopium*. En tenant compte de l'allongement des hyphes, de la densité du mycélium et de l'intensité de la sporulation, la concentration de 10 p. 100 d'oxygène est la plus favorable à la culture des deux espèces. C'est à ce taux que nous nous placerons pour étudier l'influence du gaz carbonique.

2. INFLUENCE DE LA TENEUR EN GAZ CARBONIQUE

Les atmosphères utilisées sont composées d'azote, de 10 p. 100 d'oxygène et de gaz carbonique au taux variant de 0 à 28 p. 100.

Les résultats sont exprimés dans la figure 5. Par rapport à un témoin sans CO₂, la croissance de *P. roqueforti* est légèrement stimulée par l'apport de gaz carbonique. Une seule souche se singularise avec une croissance qui diminue lorsque la teneur de l'atmosphère en CO₂ augmente. En revanche *P. verrucosum* var. *cyclopium* présente une réaction inverse. Sa croissance linéaire diminue progressivement à 3, 8, 11 et 28 p. 100 de CO₂. Pour ce dernier taux, elle est inférieure de 35 p. 100 par rapport au témoin sans gaz carbonique. La sensibilité contraire à l'égard du gaz carbonique manifestée par *P. roqueforti* et *P. verrucosum* var. *cyclopium* constitue un critère différentiel pour la discrimination entre les deux espèces.

En conclusion (tab. 2), *P. roqueforti* se caractérise par ses thalles à croissance rapide, minces, strictement veloutés, fimbriés, bleu-vert foncé et par des conidiophores larges et grossièrement verveux. *P. verrucosum* var. *cyclopium* se distingue par ses thalles à croissance lente, granuleux, plus rarement veloutés et sans trace d'aggrégation, des conidiophores plus étroits et finement granuleux, des conidies plus petites. En outre les cultures de *P. verrucosum* var. *cyclopium* dégagent une forte odeur de terre mouillée rappelant celle des *Streptomyces* alors que les cultures du *P. roqueforti* sont inodores. Sur un milieu à 68 g/l d'acétate, *P. roqueforti* est fortement inhibé ; ce milieu peut donc servir de crible pour la détection de pollution des cultures de *P. roqueforti* par *P. verrucosum* var. *cyclopium*.

P. roqueforti et *P. verrucosum* var. *cyclopium* montrent une réaction inverse aux fortes teneurs en oxygène. Contrairement à *P. verrucosum* var. *cyclopium*, à 100 p.100 d'oxygène *P. roqueforti* est fortement inhibé. Une sensibilité contraire des deux espèces étudiées se manifeste aussi à l'égard du gaz carbonique. *P. roqueforti* est légèrement stimulé par l'apport de CO₂ ce qui est en accord avec les travaux de Golding [2] sur le *P. roqueforti* cultivé sous atmosphère à faibles teneurs en CO₂. En revanche le gaz carbonique inhibe la vitesse de croissance du *P. verrucosum* var. *cyclopium*. *P. verrucosum* var. *cyclopium* est donc très aérophile ; *P. roqueforti* est plutôt micro-aérophile.

Remerciements

Nous remercions les scientifiques et techniciens de Lacto-Labo S.A. pour leur aide dans la réalisation de ce travail.

Résumé

P. roqueforti constitue une entité bien définie qui se différencie de *P. verrucosum* var. *cyclopium*, composé d'un grand nombre de formes, par ses caractères morphologiques et culturaux, sa vitesse de croissance linéaire et son comportement vis-à-vis de l'oxygène et du gaz carbonique. Un milieu à 68 g/l d'acétate de sodium peut servir de crible pour la détection de pollution des cultures de *P. roqueforti* par *P. verrucosum* var. *cyclopium*, seul ce dernier se développant sur ce substrat.

Summary

COMPARATIVE STUDY OF *PENICILLIUM ROQUEFORTI* AND *P. VERRUCOSUM* VAR. *CYCLOPIUM*

Penicillium roqueforti is a well-defined species, clearly differing from *P. verrucosum* var. *cyclopium* in morphological and cultural features and by the growth response to oxygen and carbon dioxide. To detect contamination of *P. roqueforti* cultures by *P. verrucosum* var. *cyclopium* an agar medium containing 68 g/l sodium acetate is proposed. Strains of *P. verrucosum* var. *cyclopium* grow on this medium, while those of *P. roqueforti* do not.

Reçu pour publication en février 1981.

Bibliographie

- [1] GOLDING (N. S.) (1937). — The gaz requirements of molds. I. A preliminary report on the gaz requirements of *Penicillium roqueforti* (various strains of blue from cheese). *J. Dairy Sci.*, 20, 319-343.
 - [2] GOLDING (N. S.) (1940). — The gaz requirements of molds. III. The effect of various concentrations of carbon dioxide on the growth of *Penicillium roqueforti* (three strains originally isolated from blue-veined cheese) in air. *J. Dairy Sci.*, 23, 891-898.
 - [3] MOREAU (Cl.) (1974). — Moisissures toxiques dans l'alimentation. 471 p., Masson éd.
 - [4] MOREAU (Cl.) (1978). — La mycoflore des bouchons de liège. Son évolution au contact du vin. Conséquences possibles du métabolisme des moisissures. *Rev. de Mycol.*, 42, 155-189.
 - [5] PELHATE (J.) (1974-1975). — Mycoflore des maïs-fourrages ensilés. Déterminisme de son évolution. *Rev. de Mycol.*, 29, 65-95.
 - [6] SAMSON (R. A.), STOLK (A. C.) and HADLOK (R.) (1976). — Revision of subsection fasciculata of *Penicillium* and some allied species. *Studies in mycology*, n° 11, 47 p.
 - [7] SAMSON (R. A.), ECKARDT (C.) and ORTH (R.) (1977). — The taxonomy of *Penicillium* species from fermented cheeses. *Ant. van Leeuw.*, 43, 341-350.
-