

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA MICROFLORE PRESENTE SUR LES AKENES DU TOURNESOL

M.R. DE MAGALHAES; M. LEWES DE BARROS*

1. INTRODUCTION

L'objet de ce travail est d'apporter une contribution a l'étude de la microflore présente sur les akenes du tournesol, étant donné l'intérêt de la détérioration subie par les "graines" pendant la période de stockage, due a sa durée et aux effets de la teneur en eau et de la température sur l'activité biologique et l'évolution relative des microorganismes et au fait que beaucoup d'espèces peuvent élaborer des substances toxiques et allergiques.

L'intérêt accordé aux moisissures et a leurs effets ne date pas de si longtemps. D'après Jemmali (1974) les pollutions microbiennes des produits agricoles et alimentaires et les altérations et les dangers qu'elles occasionnent, ne concernaient auparavant, que les bactéries et leurs éventuelles toxines. La formation de toxines puissantes par les moisissures (Martin and Gilman, 1976; Jemmali, 1976; Dupaigne, 1978) doit nous inciter a prendre tres au sérieux le problème de contamination par la flore fongique a laquelle, dans l'exposé qui va suivre, nous attacherons surtout notre attention.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE ETUDIE

Nos essais ont été faits sur les akenes de 5 échantillons de tournesol (tableau 1), pour évaluer leur microflore externe. Les

* Missao de Estudos Agronomicos do Ultramar
(Junta de Investigacoes Cientificas do Ultramar)
Lisboa-Portugal

“graines” de chaque échantillon ont été introduites en bocaux étanches, stockés a la température ambiante pendant 5 mois (novembre 1977-mars 1978).

2.2. METHODES UTILISEES

2.2.1. Détermination des teneurs en eau

On a procédé a leur détermination employant la méthode de séchage en étuve a 103° C. jusqu'à l'obtention de masse constante et on a obtenu les résultats écrits sur le tableau 1.

2.2.2. Analyse microbiologique quantitative par la méthode des dilutions

Pour effectuer la numération des microorganismes nous avons employé la méthode des dilutions —ensemencements, après préparation d'une suspension-mère.

La technique a été déjà rapportée par un de nous (Barros, 1966) pour les grains de café. A cause des conditions du laboratoire, nous avons été obligés de substituer l'agitateur a secousse “Prolabo” antérieurement employé, par un agitateur “Y.K.” mais malgré cela, la technique de suspension a été pareille a celle décrite par Barros (1966). En ce qui concerne l'agitation nous avons utilisé une vitesse choisie, toujours la meme et on n'a pas employé de temps de trempage avant celle-la.

3. CHOIX DE CONDITIONS DE TRAVAIL. RESULTATS EXPERIMENTAUX

3.1. TEMPERATURE ET MILIEU DE CULTURE

On a incubé les boites de Pétri aux températures de 25° et 30° C et, l'on a choisi cette dernière temperature d'après un essai fait au préalable (Magalhaes, 1978). En outre, c'était aussi la température choisie par Barros (1966) pour le dénombrement de la microflore du café.

On a utilisé les milieux de culture suivants: Malt 2% (INRA*), PDA (Difco), PCA (Difco) et Czapeck 3% et 30% et, une fois de plus

* Composition: 20 g. de malt, 5 g. de peptone, 18 g. de agar et 1 litre d'eau distillée.

(Barros, 1966) on a vérifié la supériorité ddu milieu Malt 2% (Magalhaes, 1978).

3.2. NIVEAU DE CONTAMINATION DES ECHANTILLONS

Considérant les comptages de colonies de bactéries et de moisissures, d'après 5 essais faits au préalable (Magalhaes, 1978), entre 30 et 300 (Barros, 1966) nous avons choisi les dilutions suivantes:

| | | | | | |
|---------------|-------|------------------|---------------|-------|------------------|
| Echantillon A | | 10 ⁻⁴ | Echantillon D | | 10 ⁻³ |
| Echantillon B | | 10 ⁻¹ | Echantillon E | | 10 ⁻¹ |
| Echantillon C | | 10 ⁻² | | | |

On trouve sur le tableau 2, l'étude comparative du dénombrement de la microflore faite au moyen de la méthode des dilutions et de la technique de suspension. Les chiffres sur le tabeau correspondent a la moyenne du nombre de colonies de bastéries et de moisissures trouvés entre 30 et 300 et multipliés par le facteur de correction**.

D'après le tableau 2 on peut conclure que:

— La teneur teneur en eau a une influence sur le niveau et la nature de la contamination de l'échantillon. Ainsi, on peut observer qu'au fur et à mesure que la teneur en eau se réduit (d'échantillon en échantillon), il y a aussi une diminution de la microflore fongique présente, qu'on peut considéerer négligeable pour les échantillons C et D. Il nous faut cependant mettre en évidence que, pour l'échantillon E, Malgré sa faible teneur en eau, il existe encore une certaine contamination fongique, mais il ne faut pas oublier qu'il s'agit d'un échantillon de 1976.

— On a vérifié aussi que pour les échantillons de 1977 et, d'une certaine façon pour celui de 1976, les bactéries semblent être moins affectées que les moisissures par les faibles teneurs en eau, comme d'ailleurs le référent d'autres auteurs. Nous ne pouvons pas cependant émettre une conclusion valide et la généraliser, étant donné que nous n'avons pas pu avoir une connaissance des conditions antérieures de stockage qui, elles aussi conditionnent la nature de la microflore.

** $\frac{120 \times 500 \text{ ml.}}{29 \text{ ml. } 50 \text{ g.}}$; x = 60 colonies/gramme dâkenes pour la dilution 10⁻¹ (Barros, 1966).

— Pour les échantillons B et C d'origine différente, malgré leurs teneurs en eau presque identiques, on vérifie un équilibre entre bactéries et moisissures sur le premier, tandis que le second nous montre une prépondérance marquée de bactéries. Une telle situation résulte certainement de différents degrés de contamination initiale.

3.3. REPRODUCTIBILITE DE LA METHODE

Pour l'évaluation de la reproductibilité de la technique de suspension, traduite par le nombre de colonies/gramme de "graines" de tournesol on a fait des répétitions des analyses sur un seul échantillon (A), tableau 3.

Les écarts-type de l'erreur estimés ont été de 0,1004 pour les moisissures et de 0,103 pour les bactéries. Etant donné que ces valeurs sont bien inférieures au seuil critique de 1, on peut conclure

TABLEAU 1

Caractérisation et teneurs en eau des échantillons étudiés

| Echantillon | Variété | Année de récolte | Région | Teneur en eau (%) |
|-------------|-------------|------------------|----------------------|-------------------|
| A | Pérédovick* | 1977 | Ferreira do Alentejo | 9,60 |
| B | Pérédovick | 1977 | Evora | 7,54 |
| C | Pérédovick* | 1977 | Mourão | 7,56 |
| D | Vniimk 6540 | 1977 | Vila Franca de Xira | 6,94 |
| E | Vniimk 6540 | 1976 | Vila Franca de Xira | 6,17 |

* Le fournisseur n'a pas pu nous certifier si l'échantillon n'avait pas de mélange.

TABLEAU 2

Niveau de contamination des échantillons

| Echantillon | Teneur en eau (%) | Nombre de milliers de colonies/gramme de "graines" de tournesol | |
|-------------|-------------------|---|-----------|
| | | Moisissures | Bactéries |
| A | 9,60 | 6165 | 9675 |
| B | 7,54 | 4,86 | 4,49 |
| C | 7,56 | négligeable | 81,9 |
| D | 6,94 | négligeable | 1404 |
| E | 6,17 | 2,42 | 3,15 |

que la méthode étudiée est hautement reproductrice. En outre la transformation utilisée, en conséquence de l'invariance de l'analyse de variance pour les transformations linéaires, rend ces résultats indépendants du coefficient choisi, qui d'ailleurs prend sa raison d'être dans la technique expérimentale utilisée*.

TABEAU 3

Reproductibilité de la technique de suspension sur l'échantillon A (Dilution 10⁻⁴)

| Essais | Comptage direct des colonies/boîte de Pétri | | | | Nombre de milliers de colonies/g d'akenes | | | |
|--------|---|-----|-------|-----|---|-------|-------|------|
| | Lot 1 | | Lot 2 | | Lot 1 | | Lot 2 | |
| | M | B | M | B | M | B | M | B |
| 1 | 118 | 183 | 92 | 162 | 5820 | 10290 | 6510 | 9060 |
| | 76 | 160 | 125 | 140 | | | | |
| 2 | 95 | 145 | 119 | 125 | 6700 | 7950 | 6960 | 7770 |
| | 129 | 120 | 113 | 134 | | | | |
| 3 | 61* | 160 | 109 | 173 | 4830* | 9690 | 6690 | 9690 |
| 3 | 100 | 163 | 114 | 150 | | | | |

— Moisissures (M) et bactéries (B)

* Dû au développement de colonies de Mucorales

3.4. ANALYSE QUALITATIVE DE LA FLORE FONGIQUE

Les échantillons étaient contaminés surtout par des moisissures appartenant à l'ordre des Mucorales, particulièrement les échantillons A et B et, on a trouvé aussi des *Aspergillus* spp. et *Penicillium* sp.

Sur l'échantillon A, on a observé surtout *Rhizopus arrhizus* (Barros, 1979) et d'autres Mucorales, *Penicillium* sp. et *Aspergillus* des groupes *ochraceus* et *terreus* et sporadiquement *Fusarium* sp. et *Alternaria* sp.

Quant aux lots B, en outre que les Mucorales (*Rhizopus arrhizus* et d'autres *R.* et *Mucor* sp.) on a trouvé surtout *Penicillium* sp. et aussi *Aspergillus niger* particulièrement *A. niger* var. *carbonarius* et en moindre quantité *Fusarium* sp. et *Trichothecium roseum*.

* Nous remercions à Monsieur J. T. Mexia, ingénieur de notre organisme, l'analyse statistique et l'interprétation ci dessus exposée.

En ce qui concerne les échantillons C et D, malgré leur faible contamination fongique on a trouvé sur le premier des Mucorales (*Rhizopus* sp. et *Mucor* sp.), *Penicillium* sp. et *Botrytis cinerea* et sur le deuxième *A. niger*, *Penicillium* sp, *Alternaria* sp. et aussi des Mucorales.

L'échantillon E a montré la plus faible contamination par des Mucorales relativement aux autres échantillons et inversement une forte contamination par *Penicillium* sp. et *Aspergillus* spp. (surtout *A. niger* var. *carbonarius* et d'autres *Aspergillus* des groupes *A. flavus* et *A. ochraceus*) et, on a aussi observé *Alternaria* sp.

4. CONCLUSION

L'objet de ce travail a été d'attirer l'attention de ceux qui s'intéressent aux problèmes de stockage et du tournesol en particulier, sur l'importance latente des microorganismes et surtout de la flore fongique en considérant pour parier comme Jemmali (1974), que "le problème d'élimination de toxines n'a pas de solution réellement satisfaisante, mieux vaut éviter la contamination que tenter d'éliminer le contaminant".

BIBLIOGRAPHIE

- BARROS, Maud L., *Recherche d'une méthode de numération des microorganismes présents sur cafés verts commerciaux*. «Garcia de Orta», Lisboa 14 (4), 1966, p. 521-528-b.
- BARROS, Maud L., *Information sur les maladies du tournesol au Portugal*. Lisboa, Missão de Est. Agronômicos do Ultramar, présenté à la «3^{ème} Consultation du Réseau FAO de Recherches sur le Tournesol», Versailles, 23-26 octobre 1979, 13 p. (dactilo).
- DUPAIGNE, P., *Les mycotoxines et les fruits*. «Fruits», Paris, 33 (7-8), 1978, p. 505-519.
- JEMMALI, M., *Contamination par la flore fongique*. «Bull. Techn. Inf. Min. Agric.», Paris, 287, 1974, p. 89-99.
- JEMMALI, M., *Dosage des mycotoxines*. «Cahiers Nutrit. et Diétét.», Paris 17 (5), 1976, p. 392-394.
- MAGALHÃES, M. Rita, *Microflora en aquênios de Girassol. Contribuição para o seu estudo*. Lisboa, Instituto Superior de Agronomia 1978, 73 p. (Relatório de Estágio do Curso de Eng^o-Agrônomo), (dactilo).

- MARTIN, P. M. D. & GILMAN, G. A., *A consideration of the mycotoxin hypothesis with special reference to the mycoflora of maize, sorghum, wheat and groundnuts*. London, Tropical Products Institute, 1976, 112 p. (Report G105).