



HAL
open science

Caractérisation des micro-organismes dans les taches de foxing des papiers :nouvelles approches analytiques

Malalanirina S Rakotonirainy, Sarah Boudih, Marcel Delaforge

► To cite this version:

Malalanirina S Rakotonirainy, Sarah Boudih, Marcel Delaforge. Caractérisation des micro-organismes dans les taches de foxing des papiers :nouvelles approches analytiques. Support Tracé, 2011. hal-02947966

HAL Id: hal-02947966

<https://hal.science/hal-02947966>

Submitted on 29 Sep 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Caractérisation des micro-organismes dans les taches de foxing des papiers : nouvelles approches analytiques

Malalanirina S. Rakotonirainy*, Sarah Boudih*, Marcel Delaforge**

Introduction

La présence de moisissures est une menace importante pour les collections car la détérioration fongique de leurs matériaux constitutifs est quasiment irréversible et peut amener à leur destruction si on n'intervient pas. Parmi les diverses altérations caractéristiques des œuvres sur papier, la présence de taches de couleur, pouvant aller du jaune au brun, connues sous le nom de « foxing », pose un sérieux problème pour leur conservation. Elles sont inesthétiques et, à long terme,

peuvent gêner la lisibilité de l'œuvre ou du document. Ces altérations sont liées au vieillissement de la cellulose catalysé par différents agents (éléments métalliques, gélatine...) [Bicchieri M. *et al.*, 2001 ; Bicchieri M. *et al.*, 2002 ; Missori M. *et al.*, 2006]. Elles sont souvent fluorescentes lorsqu'elles sont excitées par un rayonnement UV (365 nm). Il peut également y avoir de la fluorescence dans les zones où l'altération n'est pas encore visible à la lumière naturelle, correspondant probablement à des taches en formation (voir figure 1).

* Centre de recherche sur la conservation des collections (USR 3224 MNHN/CNRS/MCC), Paris, France
** URA 2096 CNRS/CEA, Saclay, France

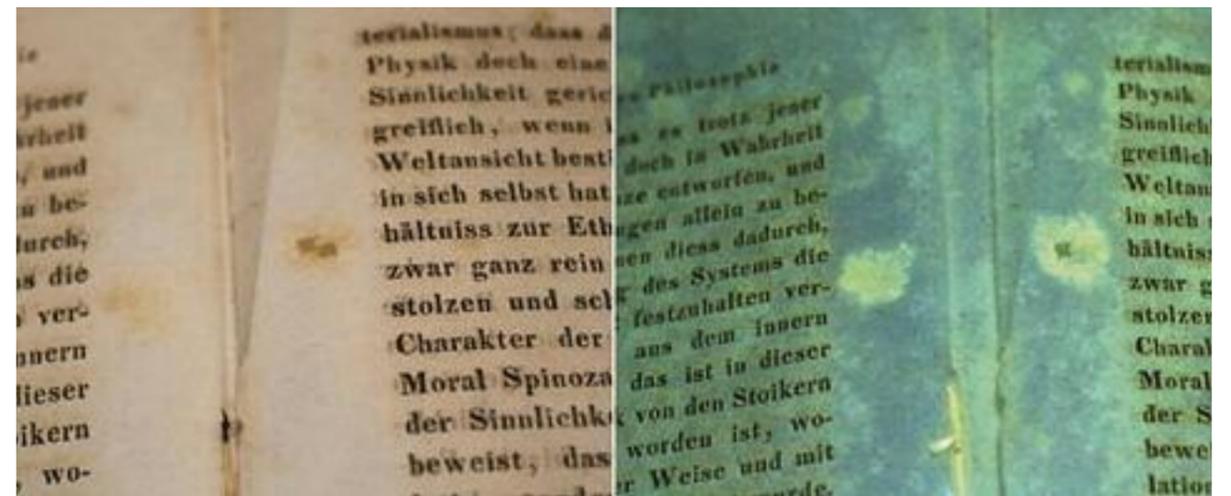


Figure 1. Observation des taches de foxing sous lumière naturelle et sous UV. © CRCC.

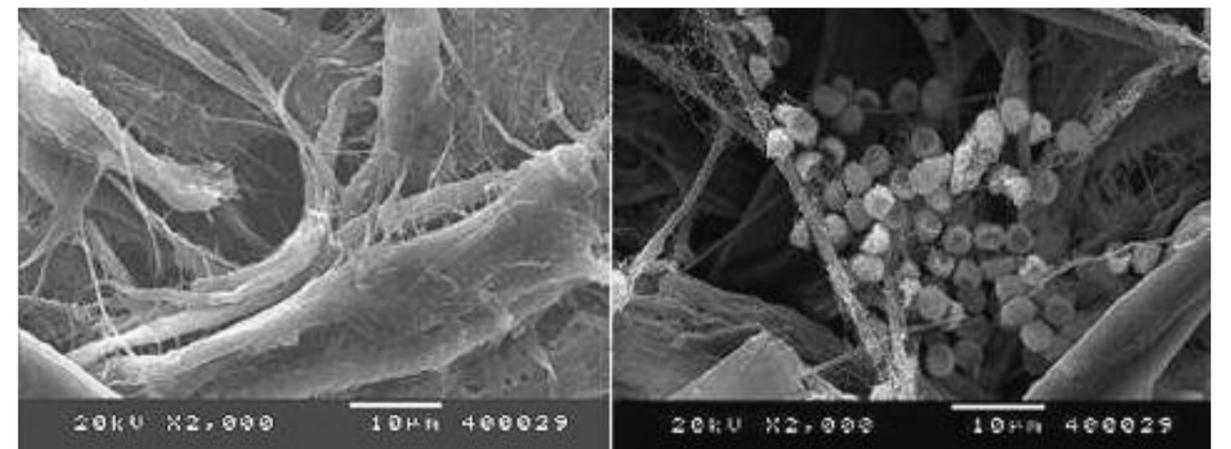


Figure 2. Observation au MEB d'une zone non tachée et d'une zone tachée, d'un papier issu d'un livre du XIX^e siècle. © CRCC.

Deux types de foxing sont généralement décrits :

- type 1 : taches irrégulières, d'une couleur jaunâtre à rousse et qui peuvent migrer d'une page à une autre, suspectées d'être d'origine biologique. L'observation microscopique de ces taches montre souvent la présence d'éléments fongiques (voir figure 2) [Florian M-L.E., Manning, L. 1999 ; Florian, M-L.E., Manning, L. 2000] ;
- type 2 : taches de forme ronde et régulière, de couleur brun foncé, n'apparaissant qu'au recto d'un papier et ne migrant pas d'une page à une autre. Ce type de tache serait causé par la corrosion de particules métalliques.

Certains auteurs considèrent l'existence d'un troisième type, où les particules métalliques et les éléments biologiques seraient présents simultanément dans une même

tache. Cette observation ne fait pas l'unanimité [Beckwith T.D. *et al.*, 1940 ; Florian M-L.E., Manning L., 2000].

En général, le développement des moisissures sur les papiers est macroscopiquement visible et leur identification est traditionnellement basée sur des observations morphologiques. Or, dans le cas du foxing, les souches ne sont pas perceptibles à l'œil nu. Leur développement est probablement limité par une faible teneur en eau du papier. L'implication réelle des souches fongiques dans le mécanisme de formation de ces taches n'a pas encore été démontrée de manière formelle. Malheureusement, leur mise en culture à partir des prélèvements réalisés sur les papiers eux-mêmes n'ayant pas toujours été positive, il est difficile d'identifier toutes les souches présentes.

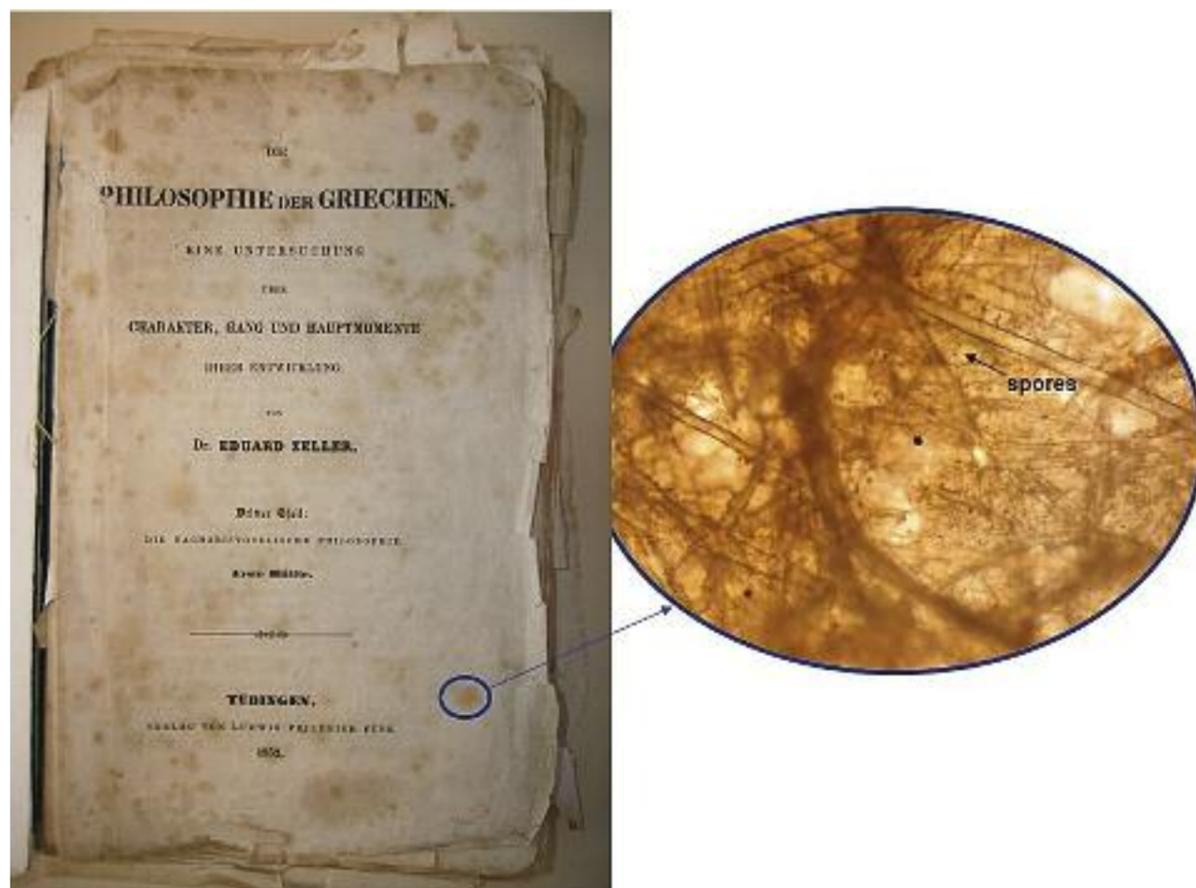


Figure 3. Livre du XIX^e siècle altéré par le foxing et observations au microscope optique d'une zone tachée. © CRCC.

Néanmoins un certain nombre d'espèces ont pu être obtenues par culture telles que : *Chaetomium globosum*, *Ulocladium botrytis*, *Eurotium pseudogalucum*, *Eurotium herbariorum*, *Penicillium chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. variable* [Arai H., 2000 ; Montemartini Corte A. *et al.*, 2003]. Cependant, les possibilités de contamination lors des mises en culture ne sont pas totalement à éliminer. Pour essayer de comprendre la difficulté de développement in vitro de la plupart des souches, nous avons évalué leur état de viabilité par ATPmétrie, méthode de diagnostic simple et rapide sans nécessité de mise en culture. L'identification des espèces est ensuite une étape indispensable, si on veut avancer des hypothèses sur le mécanisme de formation de ces taches et déterminer si les souches présentes sont « pathogènes du papier », responsables du phénomène, ou de simples opportunistes dont l'installation est favorisée par l'état du papier [Bicchieri M. *et al.*, 2001] ¹. Afin de permettre l'identification de ces espèces par une méthode autre que l'isolement et la mise en culture, nous avons opté pour l'analyse d'ADN [Rakotonirainy M.S. *et al.*, 2007] Une seconde approche a consisté à identifier des molécules produites par des champignons dont la

rémanence dans les supports peut témoigner de leur action passée. La recherche de mycotoxines au niveau de ces taches rousses sur le papier pourrait permettre de remonter jusqu'aux souches productrices et de préciser les différentes espèces fongiques qui se sont succédé pour aboutir aux altérations finales.

Support d'étude

L'expérimentation a été réalisée sur un livre de 1852, en papier chiffon à base de lin-chanvre, présentant sur plusieurs pages des taches rousses aux contours irréguliers, en forme de flocon de neige [Cain E., Miller B.A., 1982]. Au microscope optique, on peut observer la présence de spores et de mycélium, très nombreux dans les zones foxées et rares dans les zones non foxées (voir figure 3).

L'analyse élémentaire par MEB-EDS (microscope JEOL JSM 5410 LV couplé au logiciel ISIS) révèle la présence d'Al, Ca, Si et S. En revanche, aucune trace d'éléments de fer ou de cuivre n'a été trouvée : les taches observées sont donc de type 1.

Évaluation de la viabilité des souches par ATPmétrie

L'adénosine triphosphate (ATP) est un intermédiaire majeur et obligatoire du métabolisme cellulaire, car elle intervient dans la régulation de l'activité enzymatique ; elle est responsable du transport et du stockage de l'énergie nécessaire aux réactions métaboliques. À la mort des cellules, l'ATP n'est plus synthétisée et les molécules résiduelles sont rapidement dégradées par des ATPases. Les cellules mortes ne contiennent donc plus d'ATP au bout d'un certain temps. La présence de l'ATP est ainsi une caractéristique des êtres vivants. En présence d'oxygène, l'ATP peut être dosée spécifiquement par une réaction de bioluminescence grâce au complexe luciférine/luciférase de la luciole [Stanley P. E. *et al.*, 1989 ; van Crombrughe J., Waes G., 1991]. Ce dosage nécessite, dans un premier temps, l'extraction de l'ATP contenue dans les cellules. La constitution ainsi que les caractéristiques physico-chimiques des enveloppes cellulaires étant extrêmement variées d'un organisme à l'autre et d'une espèce à l'autre, les méthodes d'extraction sont également diverses [Lundin A., Thore A., 1975]. La littérature traite très peu des extractions sur les champignons, car l'ATPmétrie est encore rarement utilisée pour ces derniers. Il existe des kits de dosage ATPmétrique dans le commerce dont les réactifs d'extraction ont été optimisés pour les bactéries et ne conviennent pas à toutes les cellules fongiques. Le Centre de recherche sur la conservation des collections (CRCC) a donc mis au point une méthode d'extraction spécifique de l'ATP des moisissures à base de DMSO (diméthyl sulfoxyde) [Rakotonirainy M.S. *et al.*, 2003a ; Rakotonirainy M.S., 2007]. Le dosage de l'ATP a ensuite consisté à mettre l'ATP en présence de luciférine/luciférase. La lumière émise est mesurée dans un luminomètre qui indique la quantité de photons en RLU (relative light unity) dont le nombre est directement proportionnel à la quantité d'ATP hydrolysée. Cette méthode est appliquée ici pour la première fois sur des taches de foxing. L'extraction de l'ATP intracellulaire est réalisée avec une suspension de spores. Des morceaux de papiers d'une surface de 4,8 cm², découpés aseptiquement, sont préalablement traités avec de la cellulase et incubés une nuit à 37 °C, pour libérer les spores et les éléments fongiques des fibres de papier. Ce traitement est appliqué aussi bien sur les zones tachées que sur celles non tachées. L'extraction de l'ATP ainsi que le dosage sont réalisés suivant le protocole décrit antérieurement [Rakotonirainy M.S. *et al.*, 2003b]. Les expériences ont été répétées 6 fois.

Le nombre moyen de RLU d'un témoin sans spore, incubé dans les mêmes conditions que les échantillons à doser, est de 0,080. Le nombre de RLU dans les zones tachées varie de 8,005 à 11,890 et de 0,136 à 0,231 dans les zones non tachées, soit en moyenne respectivement $9,434 \pm 1,587$ et $0,173 \pm 0,043$.

Les valeurs de RLU dans les zones non tachées sont proches des valeurs des témoins sans spore : la quantité d'ATP dans ces zones est donc quasiment nulle. Par contre, il y a près de 10 fois plus de RLU, donc d'ATP, dans les zones foxées que dans les zones non foxées et donc 10 fois plus d'éléments viables.

Identification des espèces par l'analyse de l'ADN et résultats

Devant la difficulté d'identifier les souches fongiques présentes dans les taches de foxing par des méthodes classiques, l'utilisation d'outils de biologie moléculaire nous a paru indispensable pour nous affranchir des conditions culturelles. En effet, l'identification des champignons filamenteux est essentiellement basée sur des critères morphologiques. D'une manière générale, les échecs de culture ne sont pas exceptionnels, ils peuvent être dus à des milieux de culture non appropriés ou à la présence de souches viables mais non cultivables. Apparues il y a une trentaine d'années, les techniques de biologie moléculaire ont très vite été appliquées aux champignons pour le diagnostic et le typage des espèces. Grâce à l'extrême sensibilité de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) capable de multiplier l'ADN en plusieurs millions de copies, il est possible de détecter moins d'une dizaine de copies d'un fragment d'ADN dans un échantillon donné.

Les morceaux de papiers prélevés dans les zones tachées et non tachées sont traités avec de la cellulase, comme précédemment. L'extraction de l'ADN génomique et sa purification ont été réalisées avec du CTAB (bromure d'hexadécyltriméthylammonium) et du phénol-chloroforme, selon les protocoles couramment utilisés pour les champignons filamenteux².

Sur 110 taches étudiées provenant de diverses pages du livre, 298 clones ont été obtenus et séquencés. Les treize genres identifiés, répartis en 24 espèces, sont présentés dans le tableau 1.

Aucune espèce bactérienne n'a été détectée, mais on note deux levures avec des fréquences élevées : *Bulleromyces albus* et *Saccharicola bicolor*, et deux

Espèces identifiées et n° accession NCBI*	Nombre d'isolats	Fréquence de l'espèce %	Nombre d'isolats par genre
<i>Ascochyta skagwayensis</i> AF520640	1	0,34	75
<i>Aspergillus aculeatus</i> EU440776	1	0,34	75
<i>Aspergillus fumigatus</i> EF634384	28	9,40	75
<i>Aspergillus niger</i> EF634379	3	1,01	75
<i>Aspergillus flavus</i> GQ337422	2	0,67	75
<i>Aspergillus ustus</i> FJ78630	28	9,40	75
<i>Aspergillus pseudoflectus</i> EF65250	12	4,03	75
<i>Bjerkandera adusta</i> FJ903353	4	1,34	4
<i>Bulleromyces albus</i> AF444662	85	28,52	85
<i>Chaetomium globosum</i> AY625061	1	0,34	1
<i>Gibberella avenacea</i> EU255805	13	4,36	13
<i>Gloetinia temulenta</i> DQ235697	25	8,39	25
<i>Penicillium brevicompactum</i> DQ123637	1	0,34	47
<i>Penicillium chrysogenum</i> FJ969192	1	0,34	47
<i>Penicillium citrinum</i> LP6 EU645740	1	0,34	47
<i>Penicillium funiculosum</i> GQ337424	17	5,70	47
<i>Penicillium minioluteum</i> PECRR58SC	27	9,06	47
<i>Polyporus brumalis</i> EU162059	4	1,34	4
<i>Saccharicola (Leptosphaeria) bicolor</i> A455415	28	9,40	28
<i>Trichoderma citrinoviride</i> EU280098	3	1,01	5
<i>Hypocrea koningi</i> DQ026017	1	0,34	5
<i>Trichoderma viride</i> GQ229073	1	0,34	5
<i>Ulocladium chartarum</i> AY625071	2	0,67	2
<i>Verticillium leptobractrum</i> EF641866	7	2,35	7
Inconnu	2	0,67	2

* NCBI (National Center for Biotechnology Information)

Tableau 1. Liste des espèces identifiées par l'analyse de l'ADN à partir des taches de foxing d'un livre de 1852 en papier chiffon

basidiomycètes (*Bjerkandera adusta* et *Polyporus brumalis*) dont la présence est surprenante car ces champignons se développent généralement sur les arbres vivants. Ils ne sont pas connus comme contaminants dans les aires de stockage des documents. Parmi les champignons filamenteux, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ustus*, *Penicillium minioluteum* et *Gloetinia temulenta* sont les plus fréquents. Aucune souches d'*Aspergillus sp.* et d'*Eurotium sp.*, décrites par d'autres auteurs, n'ont été isolées [Arai H., 2000 ; Montemartini Corte A. *et al.*, 2003].

Extraction et identification des mycotoxines sur les papiers altérés par le foxing

Le papier, essentiellement constitué par de la cellulose, est facilement détérioré par les micro-organismes, et en particulier par les moisissures. On connaît près de

200 espèces de moisissures cellulolytiques. D'autres espèces non cellulolytiques se nourrissent également de divers matériaux entrant dans la composition du papier. L'amidon, la caséine ou la gélatine, utilisés comme charges ou produits d'encollage, sont en effet autant de sources potentielles d'éléments nutritifs. Ces moisissures développées sur des supports papiers peuvent sécréter des mycotoxines. Plusieurs espèces identifiées précédemment par l'analyse d'ADN sont connues pour leur production de ces métabolites secondaires. Les techniques de détection et d'identification par HPLC-UV-fluorescence et HPLC-MSn, mises au point avec des papiers peints mois, sont appliquées ici aux papiers foxés provenant de notre livre d'étude³. Les chromatogrammes obtenus par HPLC-UV (254 et 280 nm) de papiers tachés et non tachés, sont superposables et ne montrent aucun pic relatif aux mycotoxines. Ceci a été confirmé par l'analyse par spectrométrie de masse, en balayant le spectre de 150 à 800 m/z par paliers de 50, en mode positif et négatif.

Pour gagner en sensibilité d'un facteur 10 environ, les mêmes extraits ont été analysés par HPLC-Fluorescence ($\lambda_{exc} = 278 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$). Aucun pic n'a été détecté.

Pour savoir si cette matrice de papier du XIX^e siècle permet la production de mycotoxines, des échantillons de papier du livre étudié, préalablement stérilisés, ont été inoculés par une souche d'*Aspergillus fumigatus*. Après un mois d'incubation à 25 °C, sous une atmosphère humide, les analyses en HPLC-UV révèlent 2 pics : un premier à un temps de rétention de 7,5 min (m/z 652), qui n'a pas été identifié, et un second à 18 min (m/z 426) qui est probablement du lanostérol, un composé constitutif des champignons, impliqué dans la synthèse de l'ergostérol, le stérol majeur de la membrane cellulaire.

Des mycotoxines connues ont été recherchées dans ces papiers inoculés par *A. fumigatus*. La tryptoquivaline J (m/z 401, tR = 10,5 min) et la fumigaclavine A (m/z 299, Rt 11 min) ont été détectées respectivement en mode d'ionisation négative et positive. Trois pics sont observés à m/z 442 en mode négatif. Celui obtenu à tR 13 min correspond à la fumiquinazoline C. De l'acide helvolique a également été mis en évidence à m/z 567, tR 14,9 min. Les moisissures sont donc capables de sécréter des mycotoxines sur le support papier XIX^e siècle et l'absence de mycotoxines lors de l'analyse précédente est due soit à leur dégradation soit, plus probablement, à la limite de détection des appareils utilisés qui est de 10⁻⁷ M.

Conclusion

À partir d'un livre du XIX^e siècle en papier chiffon, altéré par de nombreuses taches de foxing, de nouvelles approches analytiques indépendantes de la mise en culture ont été utilisées dans cette étude pour caractériser les micro-organismes présents dans ces taches.

L'ATPmétrie a mis en évidence la présence importante d'éléments viables à l'intérieur des taches. L'absence de développement in vitro pourrait s'expliquer par le fait que les souches présentes soient devenues difficilement cultivables.

Aucune souche bactérienne ou d'actinomycète n'a été détectée par l'analyse de l'ADN, par contre, plus d'une vingtaine d'espèces de champignons dont certaines n'ont jamais été isolées sur les documents ou dans les aires de stockage des collections graphiques, ont été identifiées. Cette étude a montré l'intérêt de la biologie moléculaire

pour la détection des espèces difficilement cultivables, permettant leur identification et une estimation de leur diversité dans une communauté complexe. Le fait qu'aucun ADN n'a été extrait des zones non tachées et que plusieurs espèces ont été isolées sur une tache, est une donnée intéressante mais pour l'instant, aucune conclusion ne peut être tirée sur le rôle de ces espèces dans le mécanisme de formation du foxing. Il est donc important d'avoir des informations plus précises sur la population fongique dans les zones colorées.

Remerciements

Cette étude a été réalisée dans le cadre du Programme national de recherche sur la connaissance et la conservation des matériaux du patrimoine culturel (PNRCC 2008-2010), du ministère de la Culture et de la Communication.

Notes

1. Les micro-organismes sont dits « opportunistes » quand ils profitent d'une situation donnée (ex. dégradation du substrat) pour s'installer, se développer et éventuellement exprimer leur caractère agressif, contrairement aux pathogènes qui sont responsables de la situation.
2. L'amplification est réalisée sur l'ADN ribosomal incluant la région intergénique non transcrite ITS 1 et ITS 2 (internal transcribed spacer) et la petite sous-unité 5,8S, avec le couple d'amorces universelles ITS 4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') et ITS 5 (5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3') qui délimitent un fragment d'environ 600 à 650 pb. Les amplicons obtenus sont ensuite purifiés par clonage avec le kit TOPO TA[®] d'Invitrogen selon le protocole du fournisseur, puis séquencés. Pour chaque séquence obtenue, des séquences homologues sont recherchées via Internet, à l'aide du programme BLASTN de la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). L'identité des espèces retenue est définie pour une homologie de 98 % au moins. Après extraction, l'ADN génomique de nos échantillons de papier n'est pas visible sur les gels d'agarose, cependant un dosage au spectrophotomètre Biowave, donne des concentrations allant de 10 à 1000 ng/mL d'ADN pour les zones tachées. Après amplification, environ 87 % des extraits donnent des amplicons. Aucune amplification n'est obtenue avec les échantillons provenant des zones non tachées. Seuls les amplicons présentant des bandes bien distinctes et intenses sont sélectionnés pour le clonage.
3. Les échantillons de papiers (tachés et non tachés), d'une surface de 10 cm², sont mis dans un mélange eau/acétonitrile (ACN)/méthanol (MeOH) 40/30/30 (v/v/v), puis broyés en présence de billes de verre. Le surnageant est ensuite passé sur un filtre en PVDF de 0,45 µm, puis concentré sur une colonne SPE.

Bibliographie

Arai H., « Foxing caused by fungi: twenty-five years of study », *International biodeterioration and biodegradation*, vol. 46, 2000, p.181-188.

Beckwith T.D., Swanson W.H., Liams T.M., « Deterioration of paper: the cause and effect of foxing », *Biological sciences publication*, vol. 1, n° 13, 1940, p. 299-356.

Bicchieri M., Pappalardo G., Romano F.P., Sementilli F.M., De Acutis R., « Characterization of foxing stains by chemical and spectrometric methods », *Restaurator*, 22, 2001, p. 1-19.

Biccheri, M., Ronconi, S., Romano F.P., Pappalardo L., Corsi M., Cristoforetti G., Legnaioli S., Paleschi V., Salvetti A. and Tognoni E., « Study of foxing stains on paper by chemical methods, infrared spectroscopy, micro-X-ray fluorescence spectrometry and laser induced breakdown spectroscopy », *Spectrochimica acta*, part B 57, 2002, p. 1235-1249.

Cain E., Miller B.A., « Photographic, spectral and chromatographic searches into the nature of foxing ». In *American Institute for Conservation, Preprints of papers presented at the tenth annual meeting, Milwaukee, Wisconsin, 26 – 30 May 1982*. Washington : AIC, 1982, p. 54–62.

Florian M-L.E, Manning L., « The ecology of the fungal fox spots in a book published in 1854 », *Restaurator*, vol. 20, 1999, p. 137-150.

Florian M-L., Manning L., « SEM analysis of irregular fungal fox spots in an 1854 book: population dynamics and species identification », *International biodeterioration and biodegradation*, vol. 46, 2000, p. 205-220.

Lundin A., Thore A., « Comparison of methods for extraction of bacterial adenine nucleotides determined by firefly assay », *Applied in microbiology*, vol. 30, 1975, p. 713.

Missori M., Righini M., Dupont A-L., « Gelatine sizing and discoloration: a comparative study of optical spectra obtained from ancient and artificially aged modern papers », *Optics communications*, vol. 263, 2006, p. 289-294.

Montemartini Corte A., Ferroni A., Salvo V.S., « Isolation of fungal species from test samples and map damaged by foxing and correlation between these species and the environment », *International biodeterioration and biodegradation*, vol. 51, 2003, p. 167-173.

Rakotonirainy M.S., Héraud C., Lavédrine B., « Detection of viable fungal spores contaminant on documents and rapid control of the effectiveness of an ethylene oxide disinfection using ATP assay », *Luminescence*, vol. 18, 2003a, p. 113-121.

Rakotonirainy M.S., Hanus J., Bonassies-Termes S., Héraud C., Lavédrine B., « Detection of fungi and control of disinfection by ATP-bioluminescence assay », *AICCM Bulletin*, vol.28, 2003b, p.16-22.

Rakotonirainy M.S., « Détection rapide des contaminants fongiques viables sur les documents », *Coré*, vol. 18, 2007, p. 43-47.

Rakotonirainy M.S., Heude E., Lavédrine B., « Isolation and attempts of biomolecular characterization of fungal strains associated to foxing on a 19th century book », *Journal of cultural heritage*, vol. 8, 2007, p. 126-133.

Stanley, P. E., Mc Carthy, B. J., Smither, R., *ATP luminescence: Rapid methods in microbiology*. Oxford : Blackwell scientific publications, 1989, (Society for applied bacteriology ; 26).

van Crombrughe J., Waes G., «ATP method», *Bulletin of the international diary federation*, vol. 256, 1991, p. 56-60.

Résumé

L'implication des champignons dans la formation du foxing sur le support papier n'est pas encore élucidée. Leur présence, concentrée dans les zones colorées, est constatée depuis longtemps, mais l'identité de toutes les espèces n'est pas connue du fait de la difficulté d'utiliser les méthodes classiques d'identification morphologique. En se basant sur l'analyse d'un livre du XIX^e siècle fortement endommagé par ces taches rousses, et en utilisant de nouvelles approches analytiques indépendantes de l'isolement et de la culture des micro-organismes, nous avons pu progresser dans la caractérisation de ces champignons. Grâce à l'ATPmétrie, une concentration élevée d'éléments viables dans les zones tachées, et que l'on ne retrouve pas à l'extérieur des taches, a été démontrée. Par l'analyse de l'ADN ribosomique, la présence d'une population très diversifiée d'espèces dans les zones colorées, a été mise en évidence. À partir de 110 taches, 298 souches ont été identifiées appartenant à 23 espèces réparties dans les 13 genres suivants : *Aspergillus*, *Gibberella*, *Bjerkandera*, *Bulleromyces*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Gloeotinia*, *Penicillium*, *Polyporus*, *Saccharicola*, *Trichoderma*, *Ulocladium* et *Verticillium*. Une autre approche d'identification par la recherche de myco-toxines, en HPLC-UV, HPLC-fluorescence et HPLC-MSn, n'a pas été fructueuse, probablement à cause de la trop faible concentration de ces métabolites secondaires, bien en dessous des seuils de détection des appareils actuels.

Abstract

The involvement of fungi in the formation of foxing on the paper is not yet clear. Their presence, concentrated in the colored areas is long established but the identity of all species is unknown because of the difficulty of using the traditional methods of morphological identification. Based on the analysis of a book of the 19th century greatly damaged by these brown spots, and using new analytical approaches beyond the isolation and culture of micro-organisms, we were able to advance in the characterization of these fungi. With the ATPmetry a high concentration of viable elements in the stained areas and that are not found outside the spots, has been demonstrated. By analysis of ribosomal DNA, the presence of a diverse population of species in the colored areas, was highlighted. From 110 spots, 298 strains were identified belonging to 23 species distributed in 13 genera: *Aspergillus*, *Gibberella*, *Bjerkandera*, *Bulleromyces*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Gloeotinia*, *Penicillium*, *Polyporus*, *Saccharicola*,

Trichoderma, *Ulocladium* and *Verticillium*. Another approach to species identification by the search for myco-toxins using HPLC-UV, HPLC-MSn and HPLC-fluorescence, was unsuccessful, probably due to too low concentration of these secondary metabolites, well below the thresholds detection of the current equipment.

Pour la conservation de tous les documents

Boîtes d'archives livrées montées ou à plat en cartons neutres sans acide | Boîtes réalisées sur mesure Formats spéciaux, nous consulter

SA CAUCHARD

21 / 23 passage Charles Dallery – 75011 Paris

Tél. **01 43 79 21 02**

Fax 01 43 79 98 38

sa.cauchard@wanadoo.fr