



**HAL**  
open science

# Le goût moisi-terreux du vin : contribution à la caractérisation cinétique et métabolique des moisissures associées à ce défaut organoleptique

Daniela Judet Correia

## ► To cite this version:

Daniela Judet Correia. Le goût moisi-terreux du vin : contribution à la caractérisation cinétique et métabolique des moisissures associées à ce défaut organoleptique. Alimentation et Nutrition. Université de Bourgogne, 2011. Français. NNT : 2011DIJOS012 . tel-00668171

**HAL Id: tel-00668171**

**<https://theses.hal.science/tel-00668171>**

Submitted on 9 Feb 2012

**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.



**Université de Bourgogne**

**AgroSup Dijon**

Thèse  
Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne  
Discipline : Sciences des aliments

**LE GOUT MOISI-TERREUX DU VIN : CONTRIBUTION A LA  
CARACTERISATION CINETIQUE ET METABOLIQUE DES  
MOISSURES ASSOCIEES A CE DEFAUT  
ORGANOLEPTIQUE**

Par  
**CORREIA Daniela**

Date  
**9 juin 2011**

**Devant la commission d'examen :**

Pr. Maurice Bensoussan, GTR Myco SMAE, AgroSup Dijon, Uté de Bourgogne  
Pr. Claudine Charpentier, Œnologie, UMR INRA 1131, Université de Bourgogne  
Dr. Philippe Dantigny, MCF H.C., HDR, AgroSup Dijon, Uté Claude Bernard, Lyon I  
Pr. Sabine Galindo, Microbiologie, Polytech'Montpellier, Uté de Montpellier II  
Dr. Florentina Radoi-Matei, Uté. Sc. Agronomiques Medecine Vétérinaire, Bucarest  
Dr. Sébastien Roussos, Directeur de Recherche IRD Uté. Paul Cézanne, Marseille III

Directeur de thèse  
Examineur  
Co-directeur de thèse  
Rapporteur  
Examineur  
Rapporteur

*Je dédie ce travail à mon mari Jean-Baptiste, à ma famille et mes amis.*

## *Remerciements*

*Tout d'abord, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur Maurice Bensoussan pour l'accueil dans le laboratoire, pour la confiance, le soutien, la patience et les conseils.*

*Je tiens également à remercier Monsieur Philippe Dantigny pour les longues discussions sur la mycologie prévisionnelle.*

*Je remercie Madame Claudine Charpentier de m'avoir initié au monde de l'œnologie.*

*Je remercie Madame Sabine Galindo et Monsieur Sévastianos Roussos pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.*

*J'exprime également toute ma reconnaissance à monsieur Philippe Cayot de m'avoir accepté au sein du laboratoire EMMA.*

*Un grand merci à Madame Florentina Radoi Matei de m'avoir choisie et encouragée à effectuer un premier stage à l'Université de Bourgogne en 2005.*

*Merci aussi à toutes les personnes du laboratoire, à savoir, Tatiana, Marina, Safaa, Christine, Claire, Fabien, Alison, Sophie, Pauline, Quan, Hélène, Dominique, pour leur aide et leur conseils.*

*Merci à l'ONIVINS et à FRANCE AGRIMER pour le soutien financier.*



# Le goût moisi-terreux du vin : Contribution à la caractérisation cinétique et métabolique des moisissures associées à ce défaut organoleptique

## Résumé

Certains microorganismes qui coexistent sur la vigne, peuvent avoir des effets bénéfiques sur la qualité du vin alors que d'autres peuvent être à l'origine de déviations organoleptiques. Dans la dernière décennie, dans diverses régions viticoles de France, plusieurs odeurs de moisi ou de terre ont été mises en évidence. La (-)-géosmine a été considérée comme étant le principal composé responsable de ce défaut. Des moisissures comme *Botrytis cinerea* et d'autres appartenant au genre *Penicillium* ont été souvent isolées à partir des raisins présentant l'odeur « moisi-terreuse ». Les effets de cette molécule sur la qualité des vins a motivé notre étude sur la caractérisation des moisissures responsables de ce défaut organoleptique.

A partir d'échantillons prélevés en 2007 en Bourgogne, on a identifié, par des méthodes morphologiques et moléculaires, les moisissures présentes sur les raisins. Une souche de *Penicillium expansum* (25.03) et deux souches de *Botrytis cinerea* (BC1 et BC2) ont été sélectionnées. Sur baies de raisin, la validation d'un modèle prédictif des effets combinés de la température et de l'activité de l'eau, sur la croissance des champignons, a pu être mise en œuvre. Elle a montré, sur de larges gammes de T°C et d'a<sub>w</sub>, que les modèles cardinaux avec inflexion peuvent être validés sur les produits agro-alimentaires en utilisant le gamma concept. L'étude de l'effet du cuivre sur le taux de croissance radiale et le temps de latence des moisissures, a été entreprise afin de mieux comprendre les mécanismes de résistance au cuivre des champignons et d'en déduire des résultats pour une meilleure efficacité des fongicides. Les moisissures testées ont montré une grande tolérance au cuivre, jusqu'à 4,7 mM pour *P. expansum* et jusqu'à 8, 2 mM et 7,3 mM respectivement pour *B. cinerea*, BC1 et BC2. L'étude des effets combinés des facteurs environnementaux et nutritionnels (T°C, CO<sub>2</sub>; Cu<sup>+2</sup>) sur la production de géosmine par *P. expansum*, a conduit à définir les conditions minimisant la production de géosmine. Ainsi, on a pu déterminer que le cuivre (composant actif de nombreux fongicides) est un facteur clé dans la production de géosmine par *P. expansum*.

**Mots clés :** *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, moisissure, cuivre, raisins, mycologie prévisionnelle.

# **Earthy-musty taste of wine : Contribution to kinetic and metabolic characterisation of fungal flora of grapes associated to this organoleptic deviation**

## **Abstract**

Some microorganisms that co-exist on the grapevine may have beneficial effects on the quality of wine whereas others may be at the origin of organoleptic deviations. In the last decade, several mouldy or earthy odors have been highlighted in various wine regions from France. (-)-geosmin was found to be the major compound responsible for this deviation, along with *Botrytis cinerea* and fungi belonging to the genus *Penicillium*, since they were frequently isolated from “earthy-musty” odor grapes. The extent of damage on the quality of wines, motivated our study on the characterisation of grape rot fungi.

First of all, the microflora of grapes from Burgundy vineyards was identified (morphological and molecular methods), from samples prelevated in 2007. A *Penicillium expansum* strain (25.03) and two *Botrytis cinerea* strains (BC1 and BC2) were chosen for further experiments. The validation of a predictive model for the combined effect of temperature and water activity, on the growth of fungi on grape berries, demonstrated that cardinal models with inflexion can be validated on agri-food products, over a wide range of T°C and a<sub>w</sub>, using the gamma concept. Further we were focused on the influence of copper on the lag time and radial growth rate of moulds in order to better understand copper resistance mechanisms of the fungi and the efficacy of fungicides. The moulds tested showed a great copper tolerance, 4.7 mM for *P. expansum* and 8.2 and 7.3 mM for *B. cinerea* strains, BC1 and BC2 respectively. These results motivated our study on the influence of environmental and nutritional factors (T°C, CO<sub>2</sub>; Cu<sup>2+</sup>), using a Doehlert matrix, on geosmin production of the fungi tested. Copper (the active component of the “Bordeaux mixture”) showed to be a key factor in the increase of geosmin production by *P. expansum*.

**Keywords:** *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, moulds, copper, wine grapes, predictive mycology.

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>11</b>
<b>PARTIE 1 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>14</b>
<b>1. I. Généralités sur les mycètes</b>	<b>15</b>
1. I. 1. <i>Le genre Penicillium</i>	16
1. I. 1. 1. <i>Penicillium expansum</i> - modèle d'étude	17
1. I. 1. 1. 1. Description morphologique	17
1. I. 1. 1. 2. Physiologie, Habitat, Ecologie	18
1. I. 2. <i>Botrytis cinerea</i> - modèle d'étude	18
1. I. 2. 1. Description morphologique	19
1. I. 2. 2. Physiologie, Habitat, Ecologie	19
<b>1. II. Métabolites volatils produits par les moisissures</b>	<b>20</b>
1. II. 1. <i>Composés d'origine fongique retrouvés dans les vins</i>	20
1. II. 1. 1. Composés à odeur de champignon	22
1. II. 1. 2. Composés à odeur moisie et/ou terreuse	23
1. II. 2. <i>La géosmine</i>	25
1. II. 2. 1. Caractéristiques générales	25
1. II. 2. 2. Voie de biosynthèse de la géosmine	27
1. II. 2. 2. 1. Les terpènes synthèses chez les bactéries	28
1. II. 2. 2. 2. Les terpènes synthèses chez les moisissures	30
1. II. 3. <i>Microorganismes producteurs de géosmine</i>	32
1. II. 4. <i>Facteurs influençant la production de géosmine</i>	33
1. II. 5. <i>La microflore de la baie de raisin</i>	35
<b>1. III. Méthodes d'identification des moisissures</b>	<b>37</b>
1. III. 1. <i>Méthodes d'identification conventionnelles</i>	37
1. III. 2. <i>Méthodes d'identification par biologie moléculaire</i>	37
1. III. 2. 1. Généralités sur les tubulines	38
1. III. 2. 1. 1. Identification des moisissures par les $\beta$ -tubulines	39
<b>1. IV. Le cuivre</b>	<b>41</b>
1. IV. 1. <i>Le cuivre dans la vigne et le sol</i>	41
1. IV. 2. <i>Utilisation du cuivre contre les microorganismes</i>	44
1. IV. 3. <i>Facteurs qui peuvent influencer la biodisponibilité du cuivre</i>	45
1. IV. 4. <i>Mécanismes de toxicité du cuivre</i>	47
1. IV. 5. <i>Mécanismes de résistance au cuivre</i>	48
1. IV. 5. 1. Généralités	48
1. IV. 5. 2. La résistance au cuivre des bactéries	49
1. IV. 5. 3. La résistance au cuivre des champignons	50
1. IV. 5. 4. Quelques données sur la résistance des moisissures aux métaux	54
<b>1. V. Modélisation de la croissance fongique</b>	<b>56</b>
1. V. 1. <i>Modèles primaires</i>	56
1. V. 1. 1. Modèles de germination	57
1. V. 1. 2. Modèles de croissance	58
1. V. 2. <i>Modèles secondaires</i>	58
1. V. 2. 1. Modèles cardinaux	58
1. V. 2. 2. Modèles d'inactivation	59
1. V. 2. 3. Modèles polynomiaux	59
1. V. 3. <i>Validation des modèles prévisionnels</i>	61
<b>PARTIE 2 MATERIELS ET METHODES</b>	<b>62</b>
<b>2. I. Microorganismes et milieux de culture</b>	<b>63</b>
2. I. 1. <i>Echantillonnage et dénombrement des moisissures</i>	63

2. I. 2. Milieux de culture, inoculation et dispositif d'incubation	63
2. I. 3. Dénombrement des spores	65
2. I. 4. Détection et dosage de la géosmine	65
2. I. 5. Modélisation et traitement des données	66
<b>2. II. Identification des moisissures</b>	<b>69</b>
2. II. 1. Extraction d'ADN	69
2. II. 2. Dosage de l'ADN	70
2. II. 3. Amplification par PCR	70
2. II. 4. Electrophorèse	71
2. II. 5. Séquençage et analyse des séquences	71
<b>PARTIE 3 RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>72</b>
<b>3. I. IDENTIFICATION DE LA MICROFLORE DES BAIES DE RAISINS</b>	<b>73</b>
3. I. 1. Introduction	73
3. I. 2. Analyse de la microflore fongique des vignobles de Morey	73
3. I. 3. Regroupements taxonomiques des espèces du genre <i>Penicillium</i>	74
3. I. 3. 1. Analyse hiérarchique ascendante des critères morphologiques	74
3. I. 3. 2. Intérêt taxonomique du milieu CREA	75
3. I. 3. 3. Identification moléculaire des souches de <i>Penicillium</i> isolées	76
3. I. 3. 3. 1. Analyse des séquences par comparaison à une base de données	76
3. I. 3. 3. 2. Construction de l'arbre phylogénétique	78
3. I. 4. Recherche des souches de <i>Penicillium</i> productrices de géosmine	80
3. I. 5. Conclusions	80
3. II. Validation des effets combinés de la température et de l'activité de l'eau sur la croissance de <i>Botrytis cinerea</i> et de <i>Penicillium expansum</i> sur baies de raisins.	81
3. II. 1. Présentation	81
<b>Publication 1. Correia-Judet, D., Bollaert, S., Duquenne, A., Charpentier, C., Bensoussan, M., Dantigny, P., (2010). Validation of a predictive model for the combined effect of temperature and <math>a_w</math> on growth of <i>Botrytis cinerea</i> and <i>Penicillium expansum</i> on grape berries, <i>International Journal of Food Microbiology</i>, 142, 106-113.</b>	<b>82</b>
3. II. 2. Conclusions	90
3. III. Influence du cuivre sur le temps de latence et le taux de croissance radiale de <i>Penicillium expansum</i> et de <i>Botrytis cinerea</i> .	91
3. III. 1. Présentation	91
<b>Publication 2. Correia-Judet, D., Charpentier, C., Bensoussan, M., Dantigny, P., (2011). Modelling the inhibitory effect of copper sulphate on the growth of <i>Penicillium expansum</i> and <i>Botrytis cinerea</i>. <i>Food Research International</i>, soumis.</b>	<b>92</b>
3. III. 2. Conclusions	117
3. IV. Effets combinés de la température, du dioxyde de carbone et du cuivre sur la production de géosmine par <i>Penicillium expansum</i> .	118
3. IV. 1. Présentation	118
<b>Publication 3. Correia-Judet, D., Bensoussan, M., Charpentier, C., Dantigny, P., (2010). Combined effects of temperature, copper and CO<sub>2</sub> on geosmin production by <i>Penicillium expansum</i>. <i>Journal of Applied Microbiology</i>, soumis.</b>	<b>119</b>
3. IV. 2. Conclusions	140
<b>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES</b>	<b>141</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>144</b>

<b>ANNEXE 1</b>	<b>155</b>
<b>Judet, D.,</b> Bensoussan, M., Perrier - Cornet, J.M., Dantigny, P., 2008. Distributions of the growth rate of the germ tubes and germination time of <i>Penicillium chrysogenum</i> conidia depend on water activity, <i>Food Microbiology</i> , <b>25</b> , 902 - 907.	
<b>ANNEXE 2</b>	<b>162</b>
Dantigny, P., Nanguy, M., <b>Correia-Judet, D.,</b> Bensoussan, M., 2011. A new model for germination of fungi, <i>International Journal of Food Microbiology</i> , <b>146</b> , 176-181.	
<b>ANNEXE 3</b>	<b>170</b>
Charpentier, C., <b>Correia, D.,</b> Dantigny, P., Bensoussan, M., 2011. Nouvelles données expérimentales concernant les effets du cuivre et de la température sur la croissance de moisissures d'altération de la vigne et la production de géosmine - responsable du goût moisi - terreux du vin, <i>Revue des œnologues</i> , <b>139</b> .	
<b>ANNEXE 4</b> Liste des travaux de recherche	<b>187</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
1	Différents types de métabolites volatils produits par <i>Penicillium</i>	21
2	Les défauts organoleptiques dans le domaine vinicole et les molécules impliquées	22
3	Propriétés physico-chimiques de la géosmine	25
4	Caractérisation de la géosmine dans les vins	27
5	Concentration en cuivre dans les sols de vigne	43
6	Cuivre retrouvé dans les fractions cellulaires de <i>Mucor rouxii</i>	52
7	Concentrations inhibitrices des différents métaux	55
8	Charge fongique des raisins contaminés, des vignobles de Morey	74
9	BLAST des gènes de la $\beta$ tubuline	77
<b>Tableaux publications</b>		
<b>Publication 1</b>		
1	Estimation des températures cardinales et taux de croissance optimales sur PDA à 0,99 $a_w$	84
2	Estimations des activités de l'eau cardinales et taux de croissance optimales sur PDA à 25°C	85
3	Indices mathématiques utilisées pour valider les gamma-fonctions	86
4	Détermination des taux de croissance optimales des moisissures sur raisin « Red Globe »	87
5	Valeurs cardinales reportées dans la littérature pour <i>B. cinerea</i> et <i>P. expansum</i>	88
<b>Publication 2</b>		
1	Paramètres estimés lors de la modélisation de l'influence du cuivre sur la croissance	111
2	Paramètres estimés lors de la modélisation de l'influence du cuivre sur le temps de latence	112
<b>Publication 3</b>		
1	Plan d'expériences pour l'influence de la température, cuivre et CO <sub>2</sub> sur la production de géosmine par <i>P. expansum</i>	139
2	Liste des coefficients du modèle	139
<b>Annexe 1</b>		
1	Influence de l'activité de l'eau pour la sporulation et la germination sur la distribution des taux de croissance des tubes germinatifs et sur le temps de germination des spores de <i>P. chrysogenum</i>	158
2	Estimation des paramètres obtenus lors de la germination des spores de <i>P. chrysogenum</i> sous différentes conditions d'activité de l'eau avec le modèle Logistique et le modèle de Gompertz	160
<b>Annexe 2</b>		
1	Estimations du pourcentage des spores viables de <i>P. chrysogenum</i> exposés aux vapeurs d'éthanol	165
2	Estimation des temps de germination des spores de <i>P. chrysogenum</i> déterminés par trois modèles de germination	165
3	Détermination des valeurs RMSE pour différentes données de germination dans la littérature	166
4	Estimation des paramètres obtenus lors de la modélisation de la germination de <i>F. verticillioides</i> avec le modèle asymétrique	166
5	Estimation du paramètre de conception pour différentes données de germination de la littérature	167
<b>Annexe 3</b>		
1	Le défaut moisi-terreux dans le domaine vinicole et les molécules impliquées	170
2	Charge fongique des raisins contaminés des vignobles de Morey-St-Denis	172

## LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	Cycle de vie de <i>Penicillium chrysogenum</i>	17
2	<i>Penicillium expansum</i> aspect micro- et macroscopique	18
3	<i>Botrytis cinerea</i> aspect micro- et macroscopique	19
4	Composés volatils à odeur de champignon	23
5	Composés volatils à odeur moisie et/ou terreuse	24
6	Structures énantiomères de la géosmine	26
7	Voie de biosynthèse de la géosmine	28
8	Cyclisation du FPP catalysée par la sesquiterpène synthase de <i>S. coelicolor</i>	29
9	Aristolochène - mécanisme chez <i>P. roqueforti</i>	30
10	Différents types de pourritures retrouvées sur les raisins	35
11	Structure d'un microtubule	38
12	Structure du gène de la $\beta$ -tubuline de <i>Neurospora crassa</i>	40
13	Feuille de vigne parasitée par le mildiou	44
14	Les mécanismes de toxicité du cuivre, au niveau de la cellule	47
15	Les mécanismes de résistance au cuivre, développés par la cellule	49
16	Images au microscope électronique des cellules de <i>Trichoderma viride</i>	52
17	Dispositif expérimental d'incubation	65
18	Cuboctaèdre avec 13 points expérimentaux pour trois facteurs	68
19	Relations taxonomiques entre les souches de <i>Penicillium</i> isolées en Bourgogne	75
20	Arbre phylogénétique des souches de <i>Penicillium</i> isolées en Bourgogne et des espèces de la base de données	79
<b>Figures publications</b>		
<b>Publication 1</b>		
1	Dispositif expérimental	84
2	Effet de la température et de l'activité de l'eau sur le taux de croissance radial de <i>B. cinerea</i> et <i>P. expansum</i>	85
3	Validation du modèle prédictif pour l'effet de la température et de l'activité de l'eau sur la croissance de <i>B. cinerea</i> et <i>P. expansum</i>	86
4	Croissance de <i>P. expansum</i> sur raisins « Red Globe »	87
<b>Publication 2</b>		
1	Effet du cuivre sur le taux de croissance et le temps de latence de <i>P. expansum</i>	114
2	Effet du cuivre sur le taux de croissance et le temps de latence de <i>B. cinerea</i> BC1	115
3	Effet du cuivre sur le taux de croissance et le temps de latence de <i>B. cinerea</i> BC2	116
<b>Publication 3</b>		
1	Influence du cuivre et de la température sur la production de géosmine par <i>P. expansum</i>	136
2	Influence du CO <sub>2</sub> et de la température sur la production de géosmine par <i>P. expansum</i>	137
3	Influence du CO <sub>2</sub> et du cuivre sur la production de géosmine par <i>P. expansum</i>	138
<b>Annexe 1</b>		
1	Relation entre le taux de croissance des tubes germinatifs et le temps de germination des spores de <i>P. chrysogenum</i>	158
2	Distributions des taux de croissance des tubes germinatifs des spores de <i>P. chrysogenum</i>	159
3	Distributions des temps de germination des spores de <i>P. chrysogenum</i>	159
4	Courbes de germination de <i>P. chrysogenum</i> pour différentes activités de l'eau	160
<b>Annexe 2</b>		
1	L'effet du paramètre de conception sur la forme de la courbe du modèle asymétrique	164
2	Courbes de germination obtenues pour <i>P. chrysogenum</i> avec le modèle asymétrique	166
3	Courbes de germination obtenues pour <i>F. verticillioides</i> avec le modèle asymétrique	167
<b>Annexe 3</b>		
1	Dispositif expérimental	171
2	Le cuivre au niveau de la vigne	172
3	Effets de la température et du cuivre sur la croissance de <i>B. cinerea</i>	173
4	Effets de la température et du cuivre sur la production de géosmine par <i>P. expansum</i>	174
5	Effets de la température et du cuivre sur la croissance et la production de géosmine par <i>P. expansum</i>	174
6	Voie hypothétique de la synthèse de géosmine chez <i>P. expansum</i>	174

## INTRODUCTION GENERALE

Un grand intérêt est porté aujourd'hui à la maîtrise de la contamination des produits alimentaires par les moisissures. Cela est consécutif à l'apparition continue de nouveaux produits et procédés de fabrication et de conservation. Pour assurer une sécurité alimentaire qui réponde aux attentes des consommateurs, les matières premières et les produits alimentaires qui en sont issus, doivent alors présenter le plus faible niveau de ce type de risque microbiologique.

Le développement des moisissures est engagé au moment où l'on commence à voir des hyphes, c'est à dire lorsque la phase de germination des spores fongiques est dépassée. Afin de mieux appréhender le développement des moisissures et ses conséquences, les études doivent alors se centrer sur le contrôle de la phase de germination des spores et ensuite sur la maîtrise de la phase de croissance mycélienne, responsable de la production de métabolites secondaires. Chacune de ces phases reste sous la dépendance des effets de facteurs environnementaux comme l'activité de l'eau, la température et le pH.

La mycologie prévisionnelle a pour but de prédire le développement des moisissures dans les produits alimentaires susceptibles d'être colonisés (Dantigny *et al.*, 2003). La cinétique de développement de ces microorganismes est évaluée par l'élaboration de modèles mathématiques.

Lorsque les moisissures se développent dans des conditions favorables, elles produisent une gamme large de métabolites secondaires, parmi lesquels des métabolites volatils (Turner *et Aldridge*, 1983). Les facteurs environnementaux et la composition du substrat de culture (température : Richard-Molard *et al.*, 1976 ; activité de l'eau : Gervais, 1990 ; nature des sources de carbone et d'azote : Yong, 1992 ; traces de métaux : Bjurman *et Kristensson*, 1992 ; ...) qui influencent de manière qualitative et/ou quantitative le développement des moisissures, ont en conséquence des effets sur la production de métabolites volatils (Larsen *et Frisvad*, 1995).

Ces métabolites volatils peuvent être assimilés à des arômes « naturels » utilisés comme additifs alimentaires (Janssens *et al.*, 1992), mais à l'inverse, ils peuvent être sources de déviations organoleptiques comme celles perçues dans l'eau (Gerber *et Lechevalier*, 1965) ou dans le vin (La Guerche, 2004).



Dans la dernière décennie, plusieurs odeurs de moisi ou de terre ont été mises en évidence dans diverses régions viticoles de France (Bordelais, Beaujolais, Val de Loire, Bourgogne) et se sont traduites par des pertes économiques. Plusieurs molécules responsables de cette déviation organoleptique ont pu être identifiées (fenchol, fenchone, 2-méthylisobornéol, géosmine, ...) (La Guerche *et al.*, 2006).

La (-)-géosmine est connue depuis longtemps comme polluant de l'eau, issue de la prolifération de bactéries filamenteuses (Gerber *et* Lechevalier, 1965) ou de *Penicillium expansum* (Mattheis *et* Roberts, 1992). Dans les vins, l'origine fongique des molécules associées au goût moisi-terreux a été démontrée (Darriet *et al.*, 2000), mais seule la géosmine s'est révélée non dégradée lors de la fermentation alcoolique.

Parmi les moisissures retrouvées dans le vignoble, *Botrytis cinerea* est l'une des plus fréquentes. C'est un contaminant recherché (« pourriture noble ») pour l'élaboration de raisins « rôtis » destinés à la production des vins liquoreux, mais c'est aussi un agent pathogène de la vigne, responsable de la « pourriture grise » et producteur de 2-méthylisobornéol. La dégradation des baies de raisins par ce champignon, favorise l'installation secondaire d'autres formes de pourriture, à l'origine de nouvelles déviations organoleptiques (La Guerche, 2004).

L'activité biocide du cuivre est connue depuis longtemps. La « Bouille Bordelaise » ( $\text{CuSO}_4 + \text{Ca}(\text{OH})_2$ ), dans laquelle l'acidité du sulfate de cuivre est neutralisée par de la chaux éteinte, est un fongicide mis au point au début des années 1880 par Ulysse Gayon et Alexis Millardet lors de leur collaboration pour protéger les vignes du « mildiou » (*Plasmopara viticola*) ; il contient 20 % (m/m) de cuivre. Depuis cette date, le cuivre est entré dans la composition de fongicides appartenant aux diverses familles chimiques (sulfates, hydroxydes, oxychlorures, ...).

Suite aux traitements préventifs de la vigne, les niveaux de cuivre peuvent atteindre de fortes concentrations dans l'environnement des ceps (Brun *et al.*, 2001). Paradoxalement, cet état favorise la prolifération et la persistance de spores du genre *Penicillium*. Yamamoto *et al.* (1985), ont ainsi montré que le genre *Penicillium* était prédominant dans des sols pollués par le cuivre. Or, il a été démontré que la production de géosmine par *P. expansum* est stimulée par la présence de cuivre (Dionigi *et* Ingram, 1994).

Des études préliminaires sur milieu modèle, en cultures pures et en co-cultures de *B. cinerea* et *P. expansum*, ont confirmé que le 2-méthylisobornéol est produit par les moisissures du genre *Botrytis* et que la géosmine est produite, entre autres, par *P. expansum* (Charpentier *et al.*, 2006). Ces deux composés qui dérivent de la voie du mévalonate, sont des

terpénoides. Ils sont considérés comme des métabolites secondaires, car leur niveau de biosynthèse n'est pas constant et varie selon les effets de facteurs biotiques ou abiotiques conditionnant la croissance des moisissures impliquées.

De ces constatations, a découlé l'étude des aspects cinétiques et métaboliques du développement fongique de deux moisissures d'altération de la vigne appartenant aux genres *Penicillium* (*P. expansum*) et *Botrytis* (*B. cinerea*), soumises aux effets de différents facteurs (température, activité de l'eau, teneur en cuivre ou en CO<sub>2</sub> dans l'ambiance).

### **Les résultats de ce travail sont présentés en quatre parties :**

Tout d'abord on a identifié, par des critères morphologiques, les moisissures présentes sur les raisins en Bourgogne. Une attention particulière a été attribuée aux espèces du genre *Penicillium*, pour lesquelles on a effectué une identification moléculaire ( $\beta$  tubuline). Une souche de *P. expansum* (25.3) et deux souches de *B. cinerea* (BC1 et BC2) ont été retenues pour nos travaux de recherche.

Dans un deuxième temps on a déterminé les valeurs cardinales de température et d'activité de l'eau de *P. expansum* 25.3 et *B. cinerea*, BC1 et BC2. Grâce au gamma concept, on a validé le modèle prédictif pour l'effet combiné de la température et de l'activité de l'eau sur la croissance de ces champignons sur baies de raisin.

La troisième partie de cette thèse décrit l'influence du cuivre sur le taux de croissance radiale et le temps de latence de *P. expansum* et *B. cinerea*. Cela, dans le but de mieux comprendre les mécanismes de résistance au cuivre des champignons et l'efficacité des fongicides.

Les résultats obtenus ont motivé, par la suite, une étude des effets combinés des facteurs environnementaux et nutritionnels (T°C, CO<sub>2</sub>; Cu<sup>+2</sup>) sur la croissance, la sporulation et la production de géosmine par *P. expansum*. Une matrice d'optimisation de Doehlert a été choisie afin de déterminer les conditions minimales de production de géosmine.

## **PARTIE 1 SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. I. GENERALITES SUR LES MYCETES

Les Mycota ou vrais champignons se répartissent en trois groupes (Whittaker, 1969). Le premier groupe, les Eumycètes, à nutrition par absorption, comprend selon la nature de leur reproduction sexuée les classes des Ascomycètes, Basidiomycètes et Zygomycètes, auxquelles sont associés les Deutéromycètes, des espèces dépourvues de phase sexuée connue et ne se multipliant que de manière végétative. Ce groupe englobe la totalité des espèces filamenteuses contenant de la chitine dans leur paroi, ainsi que toutes les espèces levuriformes. Le deuxième groupe, les Straménopiles, comprend des organismes photosynthétiques et la classe des Oomycètes, non photosynthétiques ; ces derniers rassemblent des espèces filamenteuses dont la paroi contient principalement de la cellulose. Le dernier groupe, les Myxomycètes, à nutrition par phagocytose, plus hétérogène, est constitué d'espèces caractérisées par une phase végétative dépourvue de paroi squelettique. Les champignons ne correspondent pas à un ensemble monophylétique. Le groupe des champignons à chitine, proche des Métazoaires, aurait donné naissance aux plantes vasculaires. Les champignons à cellulose seraient apparentés aux Chromophytes (algues brunes) et aux Diatomées (Giraud, 1998).

Les champignons sont constitués d'un thalle filamenteux ou unicellulaire (levuriforme). Ceux qui exhibent une forme sexuée sont considérés comme « parfaits », alors que les autres sont dits « imparfaits ». Certaines espèces pratiquent une reproduction sexuée occasionnelle, ce qui signifie que des périodes de multiplication asexuée sont interrompues par des événements de recombinaison peu nombreux. Chez les espèces levuriformes, la multiplication végétative passe par un bourgeonnement, chez les espèces filamenteuses, c'est principalement par la production de spores asexuées. La découverte tardive du caractère sexué de certains champignons a parfois conduit, en raison de contingences historiques, à une double nomenclature correspondant à la forme parfaite et imparfaite de la moisissure (Chereyathmanjiyil, 2001). Cependant, parmi les champignons se retrouvent un nombre important d'agents phytopathogènes.

### 1. I. 1. Le genre *Penicillium*

Les *Penicillium* sont très communs dans l'environnement ; ils ont pour habitat le sol les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost, les céréales, etc. Ce genre comprend entre 100 et 250 espèces. Le nom de *Penicillium* est donné par la forme de pinceau du conidiophore (du latin *penicillus*) (Pitt et Hocking, 1999).

Diverses espèces présentent un intérêt économique, elles sont cultivées au niveau industriel : pour la fabrication de fromages (*Penicillium roquefortii*, *Penicillium camemberti*), la production d'antibiotiques de type pénicillines (*Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum*), de griséofulvine (*Penicillium griseofulvum*) ou d'acide gluconique (*Penicillium purpurogenum*). Certaines espèces peuvent produire des mycotoxines.

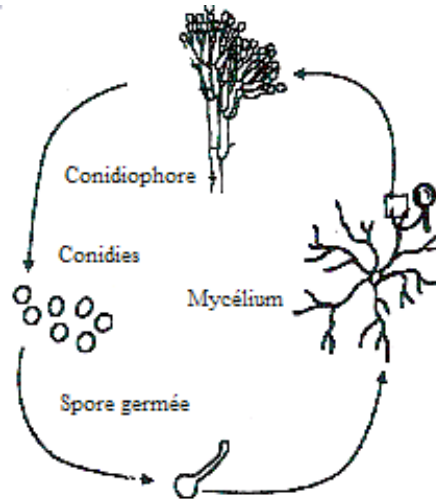
Les *Penicillium*, groupe de moisissures mitotiques (absence de reproduction sexuée), appartiennent à la classe des Hyphomycètes (thalle entièrement mycélien), et sont considérés comme Deutéromycètes ou *fungi imperfecti*. De manière inopinée, une reproduction sexuée avec formation de spores différentes (ascospores) est parfois découverte chez certaines espèces: ces *Penicillium* sont alors re-classées dans les genres *Talaromyces* ou *Eupenicillium*, suivant les caractères de la paroi ascocarpique (Pitt, 1979).

Ces moisissures se multiplient généralement de manière végétative (conidiogénèse) en produisant sur des parties aériennes (conidiophores) des spores non sexuées (conidies) et constituant, chez la plupart des espèces, un thalle vert (Dantigny *et al.*, 2005a) (Figure 1). Aspects des conidies et modalités de branchement des conidiophores sont des critères morphologiques utilisés en taxonomie. La propagation des conidies, produites en chaînes à partir de cellules appelées phialides est réalisée dans l'atmosphère ambiante (Botton *et al.*, 1990). Dans des conditions favorables d'humidité et de température, les conidies gonflent, émettent des tubes germinatifs et ensuite du mycélium visible.

Le genre *Penicillium* comprend quatre sous-genres, principalement en fonction du type de branchement du conidiophore : *Aspergilloides*, *Penicillium*, *Biverticillium* et *Furcatum* (Pitt et Hocking, 1999). La majorité des *Penicillium* isolés à partir des raisins font partie du sous genre *Penicillium*, donc ce groupe sera particulièrement décrit.

Les espèces du sous-genre *Penicillium* sont caractérisées par des moisissures au conidiophore terverticillé et des colonies avec une forte sporulation. Elles se développent à des températures basses, sont résistantes à des activités de l'eau et des valeurs de pH basses (Pitt et Hocking, 1999) et 37 °C semble marquer une limite à la croissance.

Ce sous genre est constitué de plusieurs sections en fonction de leurs caractères phénotypiques : Section *Coronata* – série *Olsonii* ; Section *Roqueforti* – série *Roqueforti* ; Section *Chrysogena* – série *Chrysogena*, *Mononematos*, *Aethiopica*, *Persicina* ; Section *Penicillium* – série *Expansa*, *Urticicolae*, *Claviformia*, *Italica*, *Gladioli* ; Section *Digitata* – série *Digitata* ; Section *Viridicata* – série *Viridicata*, *Corymbifera*, *Verrucosa*, *Camemberti*, *Solita*.



**Figure 1.** Cycle de vie de *P. chrysogenum*, d'après Dantigny *et al.* (2005a)

### 1. I. 1. 1. *Penicillium expansum* - modèle d'étude

*Penicillium expansum* est connu en tant que producteur de la pourriture poste-récolte des pommes et cerises (Mattheis *et* Roberts, 1992).

#### 1. I. 1. 1. 1. Description morphologique

- colonies sur milieu CYA : 30-40 mm de diamètre ; mycélium blanc légèrement plissé, avec des aires adjacentes floconneuses à veloutées ; conidiogenèse modérée, spores de couleur vert foncé ; exsudat clair à brun-orange pâle, pigment soluble couleur caramel ; revers pâle à brun foncé, souvent avec des aires orange-brunâtre ;

- colonies sur milieu MEA : 20-40 mm de diamètre ; mycélium généralement lisse ; conidiogenèse habituellement intense, spores de même couleur que sur CYA ou légèrement plus grises ; pigment soluble orange-brun ; revers pâle coloré par le pigment (Figure 2) ;

- les spores ont environ 5  $\mu\text{m}$  de diamètre (Pitt *et* Hocking, 1999).

### 1. I. 1. 1. 2. Physiologie, Habitat, Ecologie

- $A_w$  :  $a_{w \min} = 0,82 - 0,83$  (Mislivec *et* Tuite, 1970) ;
- $T$  °C :  $T_{\min} = \pm 3$  °C,  $T_{\text{opt}} = \pm 25$  °C,  $T_{\max} = \pm 35$  °C (Panassenko, 1967).
- niche écologique : les fruits du verger ; isolé aussi sur fraises et tomates et d'autres espèces végétales, indiquant qu'il a un spectre large ;
- production de mycotoxines : dont la patuline (Pitt, 1985 ; Pitt *et* Hocking, 1999).

*Non libre de droit de diffusion*

**Figure 2.** *Penicillium expansum*, A-sur milieu PDA, B-sur milieu MEA et CYA, C-conidiophore avec conidies, D-aspect de la contamination sur pomme (source personnelle ; [www.mycobank.org](http://www.mycobank.org))

### 1. I. 2. *Botrytis cinerea* - modèle d'étude

*Botrytis cinerea* est un champignon phytopathogène responsable de la « pourriture grise », une maladie cryptogamique qui pose des problèmes aux viticulteurs. Ce champignon est également responsable de la « pourriture noble » qui permet d'obtenir certains vins liquoreux. Le nom *Botrytis cinerea* Persoon désigne la forme asexuée (anamorphe) Deutéromycète du champignon, tandis que la forme sexuée (téléomorphe) Ascomycète est appelée *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel. *Botrytis cinerea* appartient à la classe des Hyphomycètes (thalle entièrement mycélien), à l'ordre des Moniliales, et à la famille des Moniliacées, et se développe sous la forme conidienne sur de très nombreux végétaux. Comparativement au genre *Penicillium sp.*, dans le genre *Botrytis*, le conidiophore se présente sous forme d'un arbre.

### 1. I. 2. 1. Description morphologique

- colonies sur milieu CYA et MEA : le mycélium couvre toute la boîte de Petri, aspect floconneux, mycélium blanc au départ devient gris à gris foncé au fur et à mesure qu'il y a production de spores ; revers gris ; les spores mesurent entre 8 et 10  $\mu\text{m}$  de diamètre ;
- les spores ont entre 8 et 10  $\mu\text{m}$  de diamètre ;
- les sclérotés : formés à partir du mycélium compact pour survivre aux conditions hivernales ; petits, arrondis ou de forme ovale, 2 à 4 mm de longueur, 1 à 3 mm de largeur ; d'abord blancs, ils brunissent puis noircissent par la suite ; leur surface est très brillante et marquée de fines ponctuations régulières ; ils évoluent en production de conidiophores et conidies (Pitt *et* Hocking, 1999) (Figure 3).

### 1. I. 2. 2. Physiologie, Habitat, Ecologie

- $A_w$  :  $a_{w\text{min}} = 0,90$  sur milieu à base de sucrose (Jarvis, 1977) ;
- $T$  °C :  $T_{\text{min}} = -2$  à  $5$  °C,  $T_{\text{opt}} = 22$  à  $25$  °C,  $T_{\text{max}} = 28$  à  $35$  °C (Domsch *et al.*, 1980).
- niche écologique : il représente la cause la plus importante de la pourriture des raisins avant vendanges et pendant le stockage ; il produit aussi la pourriture des fruits du verger ;
- pas de production de mycotoxines (Pitt *et* Hocking, 1999).

*Non libre de droit de diffusion*

**Figure 3.** *Botrytis cinerea*, A, B-mycélium et sclérotés, C-conidiophore avec conidies, D-aspect de la contamination sur raisins (www.mycobank.org)



## 1. II. METABOLITES VOLATILS PRODUITS PAR LES MOISSURES

Les moisissures sont connues comme productrices d'une gamme large de métabolites secondaires parmi lesquels des métabolites volatils (Turner *et* Aldridge, 1983). Ces métabolites peuvent avoir des effets plus ou moins désirés, dans les aliments ou l'environnement.

La production des métabolites peut servir à :

- l'identification des moisissures par chimiotaxonomie (Verscheure *et al.*, 2002) ;
- la détection de la croissance fongique (Abramson *et al.*, 1980) ;
- l'étude sur les déviations organoleptiques aperçues dans l'eau (Gerber *et* Lechevalier, 1965) ou dans le vin (La Guerche, 2004) ;
- la production des arômes naturels comme additifs alimentaires (Janssens *et al.*, 1992) ;
- l'étude des effets de métabolites sur d'autres microorganismes (Lanciotti *et* Guerzoni, 1993).

Les facteurs environnementaux et la composition du substrat semblent avoir une grande influence sur la nature qualitative et quantitative des métabolites volatils et donc sur l'odeur (Larsen *et* Frisvad, 1995). L'activité de l'eau (Gervais, 1990), la température (Richard-Molard *et al.*, 1976), les sources de carbone et azote (Yong, 1992), les différentes traces des métaux (Bjurman *et* Kristensson, 1992), ce sont des facteurs qui jouent un rôle important dans la production des métabolites volatils.

Les principaux métabolites volatils produits par les moisissures du genre *Penicillium* ce sont des alcools, des cétones, des esters, et des monoterpènes et sesquiterpènes (Larsen *et* Frisvad, 1995) (Tableau 1).

### 1. II. 1. Composés organiques volatils (COV) à odeur fongique, moisie et/ou terreuse dans les vins

Depuis plusieurs années, les producteurs de vin ont observé des déviations organoleptiques qui correspondent aux odeurs de champignon, de moisi, de camphré ou de terre. Ce phénomène n'est pas dû à un problème de bouchons contaminés par divers microorganismes, ou à une hygiène déficiente dans les chais. Il est lié à la présence de microorganismes sur les raisins et à leur production de métabolites volatils.

**Tableau 1.** Différents types de métabolites volatils produits par *Penicillium*, d'après Larsen *et* Frisvad (1995), Mattheis *et* Roberts (1992)

<b>Alcools et Cétones</b>	<b>Fungi</b>
1-octèn-3-ol	<i>P. camemberti, P. chrysogenum, P. commune, P. tricolor</i>
3-octèn-2-one	<i>P. decumbens</i>
3-octanone	<i>P. aurantiogriseum, P. discolour, P. echinulatum, P. freii</i>
6-méthyl-5-heptène-2-one	<i>P. vulpinum</i>
2-octanone	<i>P. coprophilum</i>
3-octanol	<i>P. camemberti, P. chrysogenum, P. commune, P. tricolor</i>
3,4-diméthyl-2-héxanone	<i>P. coprophilum</i>
2-nonanone	<i>P. olsonii</i>
<b>Esters</b>	<b>Fungi</b>
acétate d'éthyle	<i>P. aethiopicum, P. atramentosum, P. brasilianum, P. camemberti</i>
acétate d'isopropyle	<i>P. brevicompactum, P. digitatum</i>
isobutanoate de méthyle	<i>P. atramentosum</i>
propanoate d'éthyle	<i>P. crustosum, P. digitatum, P. griseofulvum</i>
acétate d'isobutyle	<i>P. aethiopicum, P. atramentosum, P. brasilianum, P. camemberti</i>
isopentanoate de méthyle	<i>P. coprobium, P. coprophilum, P. glandicola, P. purpurogenum</i>
<b>Monoterpènes</b>	<b>Fungi</b>
citronellène	<i>P. clavigerum, P. formosanum, P. italicum, P. panamense</i>
β-myrcène	<i>P. roqueforti, P. vulpinum, P. brasilianum</i>
limonène	<i>P. brasilianum, P. hirsutum var. venetum, P. olsonii</i>
linalool	<i>P. italicum, P. roqueforti, P. decumbens</i>
2-méthylisoborneol	<i>P. camemberti, P. commune, P. crustosum, P. discolour, P. polonicum</i>
<b>Sesquiterpènes</b>	<b>Fungi</b>
géosmine	<i>P. expansum, P. roqueforti, P. clavigerum, P. echinulatum,</i>
cyperène	<i>P. glabrum, P. brasilianum</i>
germacrène B	<i>P. glabrum</i>
patchoulène	<i>P. roqueforti</i>
β-cubébène	<i>P. hirsutum var. albocoremium, P. allii</i>
eremophilène	<i>P. roqueforti</i>
β-bisabolène	<i>P. expansum, P. vulpinum</i>

En fonction des situations géographiques ou des millésimes, certaines molécules peuvent être produites de façon majoritaire. Il y a des composés qui sont perçus dans les mouûts mais leur intensité peut être affectée pendant la fermentation alcoolique (Tableau 2).

**Tableau 2.** Les défauts organoleptiques dans le domaine vinicole et les molécules impliquées

Molécule	Odeur	Seuil olfactif dans le vin (ng/l)	Rémanence au cours de la vinification	Références
1-octèn-3-ol	Champignon de Paris	20 000	Peu dégradé durant la *FA	La Guerche, 2004
1-nonène-3-one	Champignon de Paris	20	Apparition durant la FA	La Guerche, 2004
1-octèn-3-one	Champignon frais	30	Potentiellement dégradée durant la FA	La Guerche, 2004
Géosmine	Moisi, Terreux	50	Après la FA	Darriet <i>et al.</i> , 2000
2-méthylisoborneol	Moisi, Terreux	55	Éliminé durant la FA	La Guerche <i>et al.</i> , 2003
(+)-Fenchol	Terreux	50 000 (dans l'eau)	A un niveau inférieur au seuil olfactif	La Guerche <i>et al.</i> , 2006
(+)-Fenchone	Terreux	500 000 (dans l'eau)	A un niveau inférieur au seuil olfactif	La Guerche <i>et al.</i> , 2006
2-méthoxy-3-isopropyl-pyrazine	Moisi	5	Rémanence partielle après la FA	Allen <i>et al.</i> , 1991
2,4,6-trichloroanisole	Moisi	3	Après la FA	Alvarez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2002

\*FA-Fermentation alcoolique

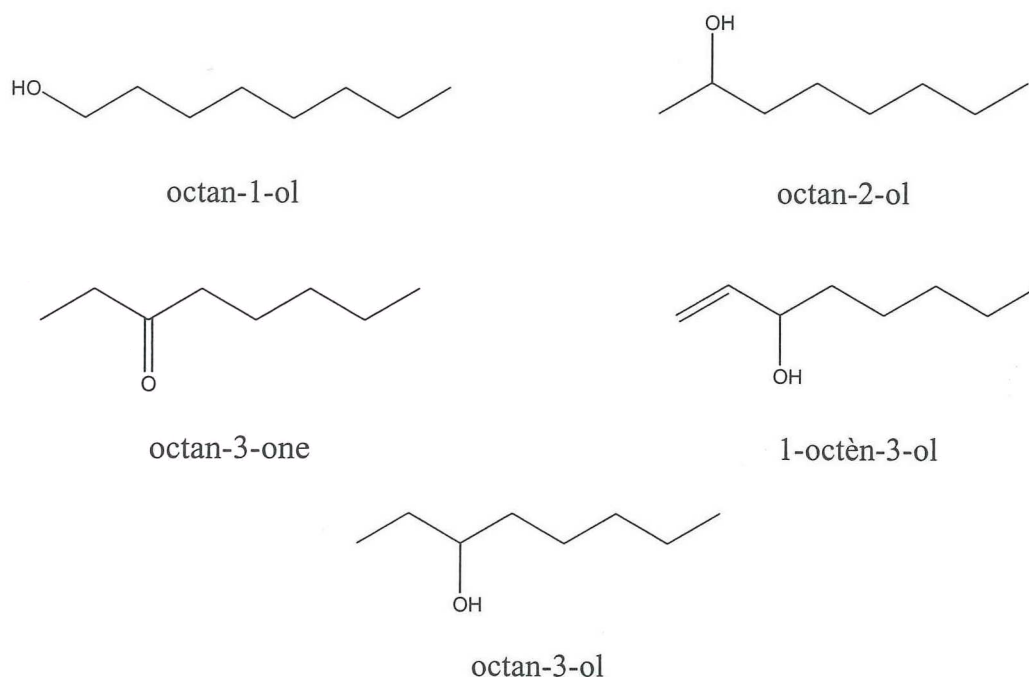
### 1. II. 1. 1. Composés à odeur de champignon

Plusieurs alcools et cétones sont à l'origine d'odeurs fongiques : octane-1-ol, octane-2-ol, octane-3-ol, 1-octène-3-ol, octane-3-one, 5-octadiène-3-ol, etc., (Husson *et al.*, 2002 ; La Guerche *et al.*, 2006) (Figure 4).

Le composé à odeur fongique le plus connu est un alcool avec huit atomes de carbone, le 1-octène-3-ol, qui possède l'odeur caractéristique du champignon de Paris. Ce composé est formé à partir du clivage de l'acide linoléique par la lipoxigénase (Husson *et al.*, 2002).

Des champignons appartenant aux genres *Botrytis*, *Aspergillus* ou *Penicillium* sont capables de produire cette odeur (Schnürer *et al.*, 1999). Parmi les espèces isolées des raisins pourris appartenant aux différentes régions viticoles de France, *A. nigri*, *B. cinerea*, *Coniothyrium sp.*, *P. brevicompactum* et *P. thomii* ont produit l'odeur de champignon (présence de 1-octène-3-ol et 2-octène-3-one) sur milieu Malt Agar ou Jus de raisin (La Guerche *et al.*, 2006).

Ces composés présentent des seuils de perception très variables situés entre le ng/L et le µg/L (La Guerche, 2004).



**Figure 4.** Composés volatils à odeur de champignon, d'après La Guerche (2004)

### 1. II. 1. 2. Composés à odeur moisie et/ou terreuse

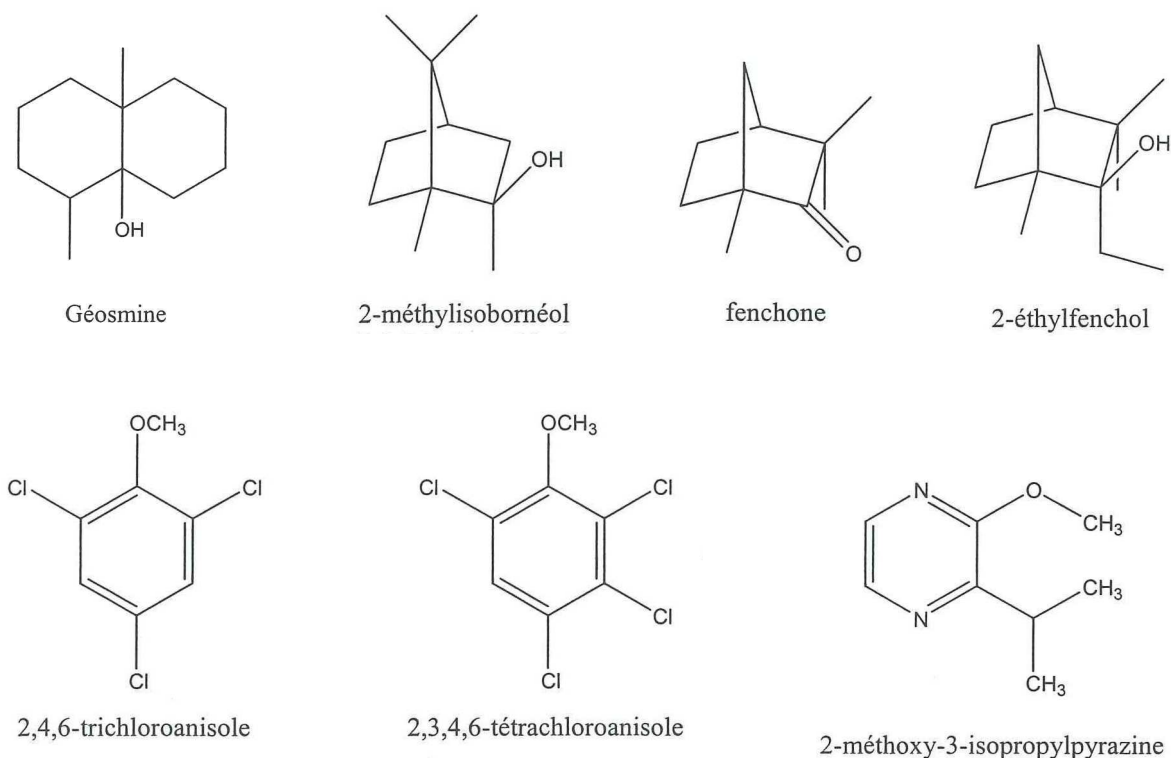
Plusieurs molécules responsables d'odeurs moisies et/ou terreuses ont été décrites dans la littérature. Parmi ces composés on peut citer des dérivés des pyrazines - 2-isobutyl-3-methoxy pyrazine, des dérivés du fenchol - 2-éthylfenchol ou des dérivés terpéniques tels que la géosmine et le 2-méthylisobornéol (2-MIB) (Sung *et al.*, 2005 ; Polak *et al.*, 1978) (Figure 5). Ces composés peuvent se retrouver dans les aliments ou peuvent participer, d'une manière positive ou non, au goût des différents produits. La géosmine apporte une note négative au sucre et une contribution positive à la betterave (La Guerche, 2004).

Parmi plusieurs moisissures isolées sur des raisins pourris provenant des diverses régions viticoles de France (Bordeaux, Beaujolais, Champagne et Bourgogne) aucune n'a été détectée comme productrice de fenchol ou fenchone (La Guerche *et al.*, 2006).

Des composés tels que le 2, 4, 6-trichloroanisole (TCA) et le 2,3,4,6-tétrachloroanisole (TeCA) présentent une odeur moisie. Le TCA a été retrouvé dans des bouchons de liège et dans les vins obturés avec ces bouchons (Amon *et al.*, 1989).

Les principaux composés à odeur de terre sont le 2-méthylisoborneol (2-MIB) et la géosmine. Ces composés ont fait l'objet de nombreuses études car ce sont des métabolites produits par des bactéries (actinomycètes), des algues (cyanobactéries) ou des champignons.

Ils ont été identifiés dans les lacs et lors de défauts organoleptiques de l'eau potable (Durrer *et al.*, 1999). Des études ont montré que le blé ou la betterave peuvent aussi être pollués par le 2-MIB ou la géosmine (Jelen *et al.*, 2003 ; Lu *et al.*, 2003).



**Figure 5.** Composés volatils à odeur moisie et/ou terreuse d'après La Guerche (2004)

Ces composés résistent à la plupart des traitements effectués sur des eaux contaminées, notamment aux oxydations chimiques (Lalezary *et al.*, 1986). Le 2-MIB est caractérisé par une odeur moisie, terreuse et camphrée avec un seuil de perception assez bas (10-15 ng/L dans l'eau, 55 ng/L dans le vin rouge). *Botrytis cinerea* est connue comme productrice de 2-MIB (Harris *et al.*, 1986). Dans une solution modèle, le 2-MIB est dégradé à 80 % après seulement 7 jours à 20 °C. Après deux semaines de fermentation alcoolique, dans un moût de *Sémillon* botrytisé, seulement 10 % de la concentration initiale de 2-MIB est retrouvée. Ce composé disparaît pendant la fermentation alcoolique et donc il n'a pas d'effet négatif sur la qualité aromatique du vin (La Guerche, 2004 ; La Guerche *et al.*, 2006).

## 1. II. 2. LA GEOSMINE

### 1. II. 2. 1. Caractéristiques générales

L'odeur terreuse, produite par *Streptomyces sp.*, a été identifiée pour la première fois à la géosmine par Gerber et Lechevalier (1965). Le goût moisi-terreux (GMT) des vins dû à la géosmine est une déviation organoleptique rencontrée depuis plusieurs années dans des cépages tels que le *Sauvignon*, le *Cabernet*, le *Pinot noir* ou le *Sémillon*. Le défaut terreux est perçu dès le niveau de la grappe de raisins. On retrouve la géosmine aussi dans des moûts avant fermentation et sa présence est toujours associée à la récolte de vendanges partiellement touchées par la pourriture grise (Darriet *et al.*, 2000).

D'un point de vue chimique, il s'agit d'un sesquiterpène avec un poids moléculaire de 182 g/mol (Tableau 3). La molécule possède trois carbones asymétriques et existe ainsi sous deux formes énantiomères : (+)-géosmine et (-)-géosmine (Figure 6). La forme (-)-géosmine est beaucoup plus odorante (La Guerche, 2004).

**Tableau 3.** Propriétés physico-chimiques de la géosmine

<b>Propriétés chimiques</b>	
Formule brute	$C_{12}H_{22}O$ trans-1, 10-diméthyl-9-cis-decalol
Masse molaire	$182,3025 \pm 0,0114$ g/mol C : 79,06 %, H : 12,16 %, O : 8,78 %
<b>Propriétés physiques</b>	
T° fusion	78 °C
T° ébullition	270 °C
Solubilité	0,55 g/L, (25 °C)
Masse volumique	$0,985$ g/cm <sup>3</sup> , (20 °C)
Point d'éclair	104 °C

La (-)-géosmine présente un seuil de perception variable en fonction de la solution dans laquelle elle se trouve : 10 ng/L dans l'eau, 50 ng/L dans un vin blanc et 60 ng/L dans un vin rouge. Ce composé a été retrouvé dans le vin de Bordeaux jusqu'à 250 ng/L (Darriet *et al.*, 2000).

**Figure 6.** Structures énantiomères de la géosmine

L'odeur de terre peut être masquée par d'autres composés volatils, donc le flairage des cultures (ou « sniffing ») n'est pas toujours suffisant (Larsen *et* Frisvad, 1995). Une partie des individus n'est pas sensible à cette molécule. L'intensité du défaut diminue rapidement au niveau du nez, mais le mauvais goût persiste dans la bouche même après avoir craché le vin. L'odeur de terre peut être masquée dans les vins aromatiques.

Pour détecter et doser la géosmine on utilise des méthodes analytiques telles que la Micro Extraction en Phase Solide (SPME) couplée à une chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) (Dumoulin *et* Riboulet, 2004). Cette méthode (SPME + GC-MS) a des limites de détection et de quantification respectives de 5 et 10 ng/L.

La Guerche *et al.* (2006) ont étudié la dégradation des principaux composés responsables de l'odeur de terre. Seulement 20 % de géosmine est dégradée dans un moût de *Sémillon* botrytisé, après deux semaines de fermentation alcoolique. Dans une solution modèle similaire au vin, 50 % de la géosmine a disparu : à 20°C après 2 mois et à 10°C après 10 mois (Tableau 4). La transformation chimique de la géosmine donne comme résultat l'argosmine, un produit moins odorant.

Une note de synthèse du groupe de travail ONIVINS de juillet 2005, ainsi que la revue publiée par l'Institut Français de la Vigne et du Vin « Goûts moisi-terreux : Origine et moyens de lutte » récapitulent les principaux moyens de prévention et de traitement du défaut moisi-terreux dans le vignoble.

L'origine fongique de la géosmine oriente les moyens de lutte préventive, vers les techniques habituellement mises en œuvre contre la pourriture grise : la réduction de la vigueur, l'aération des grappes, l'amélioration de l'intégrité des baies de raisins. Seule la combinaison de plusieurs mesures prophylactiques apporte une efficacité suffisante.

En ce qui concerne la lutte chimique, certains programmes de traitements ont donné des bons résultats contre *Botrytis*. L'emploi d'un seul produit chimique par famille et par an est impératif. L'alternance pluriannuelle des familles chimiques est fortement recommandée. Parmi les produits chimiques homologués contre la pourriture grise on peut énumérer le Geoxe, Teldor, Cantus ou le Sekoya, avec des matières actives diverses (phénylpyrrole,

hydroxyanilide, carboxamide, phényl-pyridylamine). A l'heure actuelle, aucune matière active n'est homologuée pour limiter le développement de *Penicillium*.

Une fois que la géosmine est présente dans le vin, l'élimination peut se faire seulement par fixation sur charbon ou des matières grasses ; mais ces traitements ont des conséquences sur la qualité du vin.

**Tableau 4.** Caractérisation de la géosmine dans les vins

La (-)-géosmine	Seuil de perception de la géosmine dans les vins	Propriétés physico-chimiques de la géosmine
Terre moisie, betterave	~ 50 ng/L	<ul style="list-style-type: none"> <li>- sensibilité à la chaleur ;</li> <li>- solubilité dans les graisses ;</li> <li>- dégradation en conditions acides : 50 % de la géosmine est dégradée dans 8 mois à 10 °C dans les vins</li> </ul>

Après pressurage et fermentation alcoolique, le vin rouge peut faire l'objet du traitement au lait entier ou à l'huile raffinée aux pépins de raisins. Ces traitements assurent une diminution d'environ 70 % de la géosmine. En dehors de ces produits utilisés dans le cadre expérimental, tout autre produit est interdit.

Sur les vins blancs, l'adjonction de charbon œnologique peut permettre une diminution de 90 % de la géosmine. Cependant, l'utilisation du charbon pour les traitements des goûts moisi-terreux, n'est autorisée par la DGCCRF que dans le cadre expérimental et doit être déclarée. La géosmine peut résister aux traitements conventionnels des eaux, aux traitements physiques tels que l'adsorption sur charbon actif, ou chimiques tels que la chloration et l'ozonation. Les traitements par électrochimie deviennent une alternative nouvelle pour le traitement des eaux usées contaminées par la géosmine (Li *et al.*, 2010).

#### **1. II. 2. 2. Voie de biosynthèse de la géosmine**

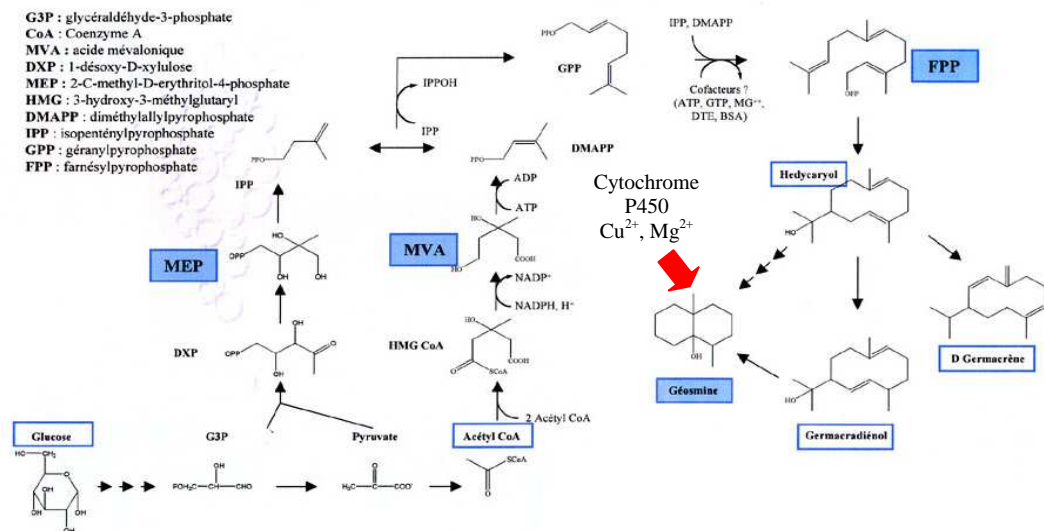
La géosmine est un sesquiterpène issu de la voie des isoprénoides (Figure 7). Plusieurs microorganismes (bactéries, algues, champignons) sont capables de produire ce composé. Le précurseur le plus important dans la biosynthèse des métabolites volatils est l'acétate, présent



dans les cellules sous forme d'acétyl coenzyme A (Verscheure *et al.*, 2002). La voie de biosynthèse de la géosmine ainsi que les facteurs qui interviennent, ne sont pas encore parfaitement connus.

Les terpènes constituent un groupe d'environ 20 000 composés avec une gamme large des fonctions biologiques : pigments, hormones, antibiotiques, etc., (Davis *et Croteau*, 2000). Les terpènes synthases peuvent être classées en mono-, sesqui- ou diterpènes synthases, en ayant comme rôle la catalyse de la cyclisation du géranyl diphosphate (GPP, C<sub>10</sub>), farnésyl diphosphate (FPP, C<sub>15</sub>) ou géranyl géranyl diphosphate (GGPP, C<sub>20</sub>).

Les sesquiterpènes synthases impliquées dans la cyclisation du farnésyl diphosphate, ont un poids moléculaire compris entre 40 et 65 kDa et utilisent le Mg<sup>2+</sup> comme cofacteur (Agger *et al.*, 2008). La farnésyl diphosphate synthase (FPS) joue un rôle important dans les cellules eucaryotes et procaryotes. Elle catalyse la condensation consécutive du diméthylallyl diphosphate (DMAPP) ou du géranyl diphosphate (GPP) avec l'isopentényl diphosphate pour produire le farnésyl diphosphate (FPP). Le FPP est le carrefour dans la voie de biosynthèse des isoprénoides.



**Figure 7.** Voie de biosynthèse de la géosmine d'après Cane *et Watt* (2003), Lamb *et al.* (2003), Shulz *et al.* (2004)

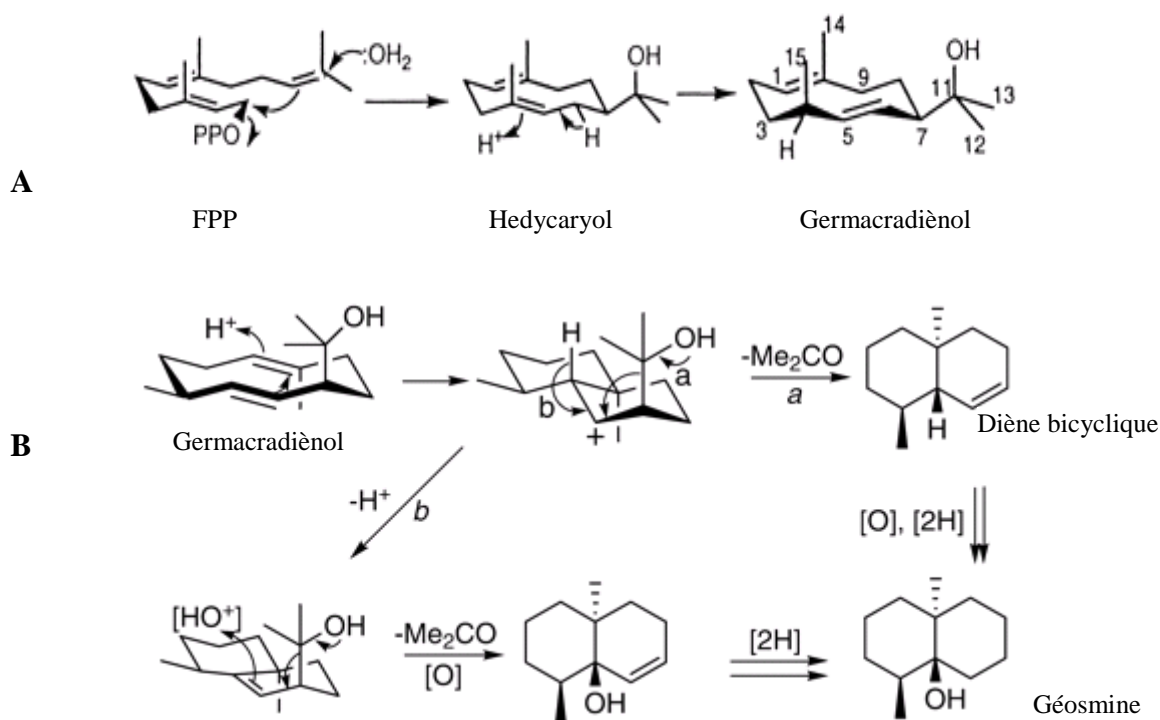
### 1. II. 2. 2. 1. Les terpènes synthases chez les bactéries

La géosmine est produite par les bactéries filamenteuses du genre *Streptomyces* dans l'eau. Depuis longtemps, de nombreuses études ont été effectuées, au niveau moléculaire, afin de comprendre les mécanismes de production de géosmine par les bactéries.

Chez *Streptomyces coelicolor* un gène appelé Sco6073 (*cyc2*) a été identifié. Ce gène code pour une sesquiterpène synthase à deux domaines (726 aa) dont un seul (N-terminal, 366 aa) est nécessaire pour la biosynthèse de la géosmine par l'intermédiaire du germacra-1 (10) E, 5E-diène-11-ol (Cane *et Watt*, 2003, Gust *et al.*, 2003).

La séquence protéique de cette sesquiterpène synthase (germacradiénol synthase) présente des similitudes avec la pentalénène synthase de *Streptomyces sp.* UC5319, qui est impliquée dans la cyclisation du FPP en 3-pentalénène en présence de  $Mg^{2+}$ . Le 3-pentalénène est le précurseur des antibiotiques de la classe des pentalénolactones.

Cane *et Watt* proposent en 2003 un mécanisme de conversion du germacradiénol en géosmine, alors que les gènes impliqués dans cette conversion n'ont pas encore été entièrement identifiés (Figure 8). Il semble que ces gènes ne se retrouvent pas proches du gène Sco6073 mais qu'ils peuvent être dispersés sur le chromosome de *S. coelicolor*.



**Figure 8.** A-cyclisation du FPP catalysée par la sesquiterpène synthase de *S. coelicolor*; B-mécanisme de conversion du germacradiénol en géosmine, d'après Cane *et Watt* (2003)

Des études ont été menées pour étudier la transformation du germacradiénol en géosmine dans des conditions «in vitro». Seulement 8 à 15 % de géosmine est formée à partir de la quantité totale des terpènes (Jiang *et al.*, 2007). Cela nous fait supposer que d'autres facteurs sont impliqués dans cette synthèse. Lin *et Cane* (2009) ont isolé à partir de *S.*

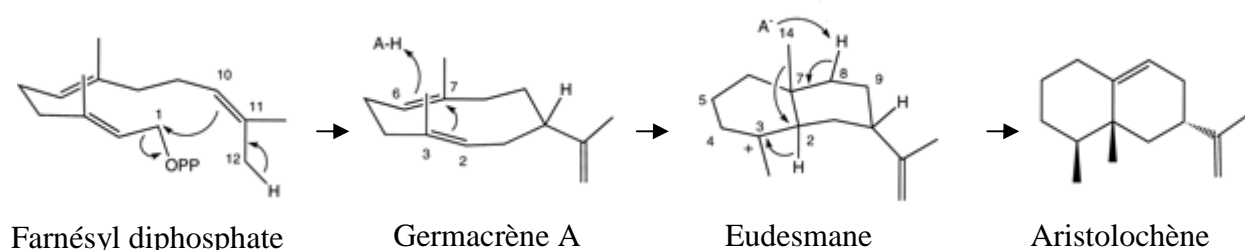
*coelicolor* et *S. albidoflavus* la sesquiterpène albaflavénone présentant une odeur de terre camphrée.

## 1. II. 2. 2. 2. Les terpènes synthases chez les moisissures

En 1993, Proctor *et* Hohn ont mis en évidence chez *Penicillium roquefortii*, le gène *aril* qui code pour l'aristolochène synthase. Le produit de cyclisation, la (+)-aristolochène, est un précurseur dans la voie de biosynthèse des sesquiterpénoïdes, notamment des toxines telles que la PR-toxine produite par *P. roquefortii*. Dans le but de mieux connaître le fonctionnement des terpènes synthases des moisissures, la structure cristalline de l'aristolochène synthase ainsi que le mécanisme de production, ont été déterminés (Caruthers *et al.*, 2000) (Figure 9).

L'expression du gène a lieu en phase stationnaire de croissance de *P. roquefortii*, dans le même temps que la production de la PR-toxine et il semble que sa transcription est régulée. Ce gène contient deux introns et il existe dans une seule copie dans le génome de *P. roquefortii*. L'aristolochène synthase ne contient pas la région (I, V, L)XDDXXD présente dans toutes les FPP synthases, mais une autre séquence LXDDXXE. Cette séquence semble être impliquée dans la liaison catalytique des ions de  $Mg^{2+}$  (Proctor *et* Hohn, 1993).

Malgré le peu de similarité au niveau de la séquence nucléotidique, la structure tridimensionnelle de l'aristolochène synthase de *P. roquefortii* présente beaucoup de ressemblance avec la pentalénène synthase de *Streptomyces sp.* UC5319 et la epi-aristolochène synthase de *N. tabacum*. Caruthers *et al.*, (2000) suggèrent la divergence d'un seul ancêtre commun dans l'évolution des terpènes synthases.



**Figure 9.** Aristolochène - mécanisme chez *P. roquefortii*, d'après Caruthers *et al.* (2000)

L'aristolochène synthase d'*Aspergillus terreus* (320 aa) a été identifiée comme enzyme de cyclisation du FPP conduisant à la formation du germacrène A (Cane *et* Kang, 2000). L'enzyme nécessite le  $Mg^{2+}$  (5 mM) en tant que cofacteur. Au niveau de la séquence

protéique une région bien conservée (riche en aspartate) a été mise en évidence, la région LIDDVLE, qui correspond à la séquence (I,L,V)XDDXX(D,E).

Entre les séquences protéiques de l'aristolochène synthase d'*A. terreus* et celle de *P. roqueforti* il y a 70 % d'identité avec des différences notables dans la partie N-terminal. La comparaison de ces deux séquences suggère qu'elles ont un ancêtre commun et les deux introns ont été présents avant la divergence de ces deux gènes, pendant l'évolution moléculaire (Cane *et* Kang, 2000).

Chez *Trichoderma harzianum*, le gène *tri5* qui code pour la trichodiène synthase (388 aa) est impliquée dans la biosynthèse des trichothécènes (Gallo *et al.*, 2004). Les trichothécènes sont des sesquiterpènes, des métabolites secondaires toxiques, produits par différentes moisissures. Cette enzyme cyclise le FPP pour former le trichodiène, le précurseur des trichothécènes.

La structure cristalline de la trichodiène synthase de *Fusarium sporotrichioides* a aussi été déterminée (Rynkiewicz *et al.*, 2001). Dans ce cas, la voie de biosynthèse qui passe par la cyclisation du FPP pour obtenir comme produit final la toxine T2 (Gallo *et al.*, 2004).

Certainement la cyclisation du FPP, pour former la géosmine ou d'autres terpènes, chez les moisissures est au moins aussi complexe que chez les bactéries. L'hypothèse de l'existence de clusters avec des gènes clés intervenant dans la cyclisation du FPP et le cytochrome P<sub>450</sub> doit être prise en compte dans l'étude sur la voie de biosynthèse.

### 1. II. 3. Microorganismes producteurs de géosmine

Les Actinomycètes sont les bactéries le plus souvent décrites comme productrices de géosmine. Ces bactéries sont de fréquents contaminants de l'eau potable, mais on les retrouve aussi dans les sols. Plusieurs espèces de *Streptomyces*, productrices de géosmine, ont été décrites : *S. albidoflavus*, *S. rishiriensis*, *S. antibioticus*, *S. aureofaciens*, *S. coelicolor*, *S. hirsutus*, *S. hygroscopicus*, *S. murinus*, etc., (Dionigi, 1995 ; Scholler *et al.*, 2002). Ces mêmes bactéries sont aussi capables de produire du 2-méthyl-isoborneol (2-MIB).

Les champignons se sont aussi révélés producteurs de géosmine. *Chaetomium globosum* fut une des premières espèces reconnue comme productrice de ce composé. (Kikuchi *et al.*, 1983)

Par la suite, on a dénombré plusieurs espèces fongiques capables de synthétiser des composés à odeur terreuse. *Penicillium* est le genre le plus fréquemment décrit comme capable de générer de la géosmine : *P. farinosum*, *P. citrinum*, *P. camemberti*, *P. chrysogenum* (Pisarnitskii *et* Egorov, 1988), *P. expansum* (Mattheis *et* Roberts, 1992), *P. aethiopicum*, *P. clavigerum*, *P. crustosum*, *P. diszcolor*, *P. echinulatum*, *P. formosanum*, *P. hirsutum* var. *venetum*, *P. roqueforti* var. *carneum* (Larsen *et* Frisvad, 1995).

*P. camemberti*, *P. commune*, *P. polonicum*, *P. solitum* et *P. vulpinum* peuvent produire du 2-MIB (Larsen *et* Frisvad, 1995)

Lebrun-Doaré (2005), a mis en évidence par analyse TTGE, les microorganismes présents sur différentes grappes altérées. La population de microorganismes diffère légèrement d'une grappe à l'autre tandis que le défaut terreux est toujours perçu. Les souches potentiellement productrices des défauts terreux sont systématiquement présentes au sein de la microflore du raisin sans forcément donner lieu au défaut dans le vin. Il existe d'une part, une concentration minimale en dessous de laquelle le défaut n'est pas perceptible et d'autre part, un état physiologique particulier des microorganismes qui permet la production de ces molécules. Il apparait aussi que certaines conditions environnementales favorisent d'une part le développement des souches et d'autre part, la synthèse des molécules (Lebrun-Doaré, 2005).

## 1. II. 4. Facteurs influençant la production de géosmine

La présence des microorganismes ne suffit pas pour expliquer les défauts organoleptiques dans les vins. Les facteurs environnementaux (activité de l'eau, pH, composition atmosphérique, agitation et température) et la composition des substrats peuvent avoir une influence sur la production des métabolites volatils. Généralement les conditions favorisant la croissance mycélienne, influencent positivement la production de métabolites volatils mais ce n'est pas toujours le cas. Les sources de carbone et d'azote jouent un rôle important dans la production des métabolites (Verscheure *et al.*, 2002).

Une étude sur les métabolites volatils produits par 47 souches de *Penicillium* a mis en évidence le fait que chaque souche est caractérisée par un profil unique d'environ 10 composés volatils. Le milieu SYES (Yeast Extract Sucrose Agar) c'est avéré à être le milieu le plus favorable à la production de ces métabolites par rapport au milieu MEA (Malt Extract Agar) et CYA (Czapek Yeast Autolysate Agar) (Larsen *et* Frisvad, 1995).

Un des facteurs climatiques à prendre en compte dans la production de géosmine par les moisissures sont les précipitations. Elles créent les conditions optimales du développement de la moisissure (Lebrun-Doaré, 2005).

*S. tendae* produit plus de biomasse et de géosmine à 30 et 40 °C, sur milieu CZA, qu'à 10 ou 20 °C, ce qui indique dans ce cas une relation entre la production de biomasse et la production de géosmine (Dionigi *et* Ingram, 1994). Chez cette même espèce et chez *S. albidoflavus* la production de géosmine est stimulée lorsque le milieu est supplémenté avec du sulfate de cuivre (Dionigi, 1995).

*Penicillium expansum* produit plus de géosmine et moins de biomasse à 40 °C tandis qu'à 20 °C la relation entre la quantité de biomasse et de géosmine produite est inversée (Dionigi *et* Ingram, 1994). Parmi plusieurs métaux ajoutés dans le milieu de culture (magnésium, cobalt, nickel ou cuivre) seul le cuivre augmente la production de géosmine (Dionigi *et* Champagne, 1996).

D'après La Guerche (2004), *P. expansum* produit l'odeur de terre sur milieu MA (Malt Agar) et sur milieu CZA (Czapek Agar). Cette moisissure ne produit pas de géosmine sur baie de raisin. Sur milieu MA, à 5 °C et après 11 jours de culture, il y a plus de géosmine, 35 ng/boîte, qu'aux autres températures testées, 15, 25 et 35 °C, respectivement 18, 9 et 2 ng/boîte. En faisant varier le pH de 3 à 7, *P. expansum* produit de la géosmine sur milieu MA à tous les pH testés mais pas sur milieu jus de raisin. L'ajout des polyphénols ou des

anthocyanes, dans le jus de raisin, ne favorisent pas la production de géosmine tandis que l'acide linoléique a une influence positive. L'ajout de 100 mg/L d'acide linoléique, favorise la production de géosmine par *P. expansum* (environ 31 ng/boîte).

Si la source d'azote du milieu CZA est modifiée par le  $\text{NH}_4^+$ , *P. expansum* produit de la géosmine. Les acides aminés tels que le glutamate et la glutamine, en tant que source d'azote dans le milieu CZA, favorisent aussi la production de géosmine. Un jus de raisin élué (élimination des polyphénols ; dans lequel a été ajouté de l'ammonium représente un milieu favorable à la production de géosmine par *P. expansum* (20 ng/boîte) en fonction de l'isolat. Un mélange entre un jus de raisin témoin et un jus de raisin percolé a montré qu'il y a production de géosmine quand la proportion de jus de raisin est inférieure ou égale à 10 %.

Dans le but de se rapprocher des conditions dans lesquelles le défaut est produit, La Guerche effectue des co-inoculations de *B. cinerea* (retrouvé systématiquement sur les raisins à défauts terreux) et *P. expansum* ; cela sur grappe entière, rafle et baie de raisin, avec des délais variables entre les deux inoculations. Aucun des couples formés entre les souches et les délais d'inoculation n'ont permis la synthèse de géosmine que ce soit sur grappe, rafle ou baie de raisin. Les seules conditions qui ont permis la synthèse ont été représentés par le jus de raisin preinoculé avec *B. cinerea* ; dès que 90% d'azote a été dégradé le jus est filtré, inoculé avec *P. expansum* et supplémenté en  $\text{NH}_4^+$ . La même expérience effectuée sur broyat de baies de raisins a permis la production de géosmine par *P. expansum* (La Guerche, 2004).

Les travaux effectués entre l'Ensat, l'Itv-France, le laboratoire Exact, la société Intelli'oen et Syngenta en 2005, ont mis en avant la production de géosmine (de 184 à 265 ng/L) par *P. expansum* seul, sur grappes de raisins blessées artificiellement. Le lot témoin contaminé avec *B. cinerea* n'a pas présenté d'odeur de terre ([www.vitisphere.com](http://www.vitisphere.com)).

Vue la variété des souches présentes sur les raisins il est possible que la géosmine ne soit synthétisée par la moisissure, qu'à partir d'une certaine quantité de mycélium. Lebrun-Doaré (2005) a montré que la production de géosmine était plus ou moins concomitante avec la sporulation, donc l'état physiologique de la moisissure peut jouer un rôle très important.

Les facteurs influençant la production d'aristolochène, le précurseur de la géosmine, par *P. roquefortii* ont été étudiés par Demyttenaere *et al.* (2002). *P. roquefortii* a une production maximale de ce composé (40 ng/L) après 4 jours de culture sur milieu SAB (Sabouraud Dextrose Agar), par rapport au milieu MEA ou PDA (Potato Dextrose Agar), où la production est moindre. Il semblerait qu'une augmentation du pH du milieu pourrait augmenter la production de (+)-aristolochène. Le pH du MEA et SAB se situe entre 5,4 et 5,6 mais l'enzyme à une activité maximale à un pH entre 6,3 et 7,5.

## 1. II. 5. La microflore de la baie de raisin

La pellicule du raisin présente une microflore variée (bactéries, levures et moisissures). Les facteurs environnementaux ou géographiques peuvent faire varier les quantités de ces micro-organismes sur la pellicule du raisin. Une partie de cette microflore participe aux étapes fermentaires du vin, mais des microorganismes peuvent produire des composés organiques volatils, générant pour certains, des arômes appréciés et pour d'autres des déviations organoleptiques, avec des molécules à seuil de perception très bas.

Parmi les bactéries on peut citer des bactéries lactiques, acétiques ou filamenteuses. *Gluconobacter sp.* se développe sur le raisin précédemment contaminé par *Botrytis* et conduit à la pourriture aigre (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004). La Guerche *et al.* (2006) montre qu'en dessous d'un pH = 6, les *Streptomyces* ne se développent pas sur milieu malt ou jus de raisin. Cela exclut donc leur croissance dans le moût ou le vin.

Les levures retrouvées sur les raisins appartiennent aux genres *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Kloeckera*, *Candida*, *Pichia* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004 ; Lebrun-Doaré, 2005).

Parmi les altérations dues aux moisissures, on remarque le genre *Cladosporium* responsable d'une pourriture vert-olive (Nair, 1985). *B. cinerea* produit la pourriture grise des raisins de cuve et de table. Suite à son développement sur les feuilles, des taches brunes peuvent être observées (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004) (Figure 10).



Pourriture grise  
*Botrytis cinerea*



Pourriture bleue  
*Penicillium sp.*



Pourriture verte-noire  
*Cladosporium sp.*

**Figure 10.** Différents types de pourritures retrouvées sur les raisins, d'après La Guerche (2004)



*Botrytis cinerea* représente un des principaux problèmes des viticulteurs, il contamine les raisins donc le vin et il produit des défauts organoleptiques. Le genre *Penicillium* fait partie aussi des espèces qui peuvent contaminer les raisins (La Guerche *et al.*, 2006). *B. cinerea* et *P. expansum* sont donc les moisissures les plus fréquemment retrouvées sur les raisins.

En dehors des déviations organoleptiques qu'elles sont susceptibles de produire, une attention particulière doit être accordée aux moisissures car elles peuvent aussi être responsables de la production des mycotoxines. *P. expansum* peut produire de la patuline.

## **1. III. METHODES D'IDENTIFICATION DES MOISSURES**

### **1. III. 1. Méthodes d'identification conventionnelles**

Traditionnellement, l'identification des moisissures repose sur l'observation de critères morphologiques (aspect macroscopique du mycélium et observation microscopique des structures reproductrices) (Pitt *et* Hocking, 1999). Parmi les critères macroscopiques, on prend en compte la couleur, la texture et la taille de la colonie sur différents milieux de culture. Les colonies peuvent être duveteuses, laineuses, cotonneuses, poudreuses ou granuleuses. L'aspect peut être plat ou plissé (*Penicillium sp.*). La taille des colonies est aussi un important critère de distinction ; les colonies peuvent être petites 5-6 cm de diamètre (*Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*) ou envahissantes, 7-8 cm de diamètre (*Botrytis sp.*). L'aspect des colonies dépend du milieu de culture.

Après étalement entre lame et lamelle, l'observation microscopique permet de mettre en évidence le type et la taille des spores, les branchements du conidiophore. Les spores peuvent être unicellulaires et de petite taille (*Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*), bicellulaires (*Trichotecium sp.*), pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (*Alternaria sp.*) ou incurvées et cloisonnées transversalement (*Fusarium sp.*) (Pitt *et* Hocking, 1999).

Cette identification nécessite une expérience confirmée dans la taxonomie des champignons et s'avère longue et fastidieuse.

La production de métabolites est un test complémentaire à l'identification morphologique. Les tests biochimiques en galeries API (BioMérieux) ou « FF Microplates » (BIOLOG) avec différents substrats carbonés à métaboliser, peuvent aussi être utilisés pour la discrimination des champignons. Ces méthodes ne permettent pas une différenciation suffisante et nécessitent souvent la confirmation par d'autres méthodes. Ces dernières années, de nombreuses méthodes moléculaires ont été développées afin d'obtenir des résultats fiables.

### **1. III. 2. Méthodes d'identification par biologie moléculaire**

L'analyse directe de séquences de l'ADN a permis le développement de méthodes d'identification faibles et spécifiques. Ces méthodes sont universellement applicables et

permettent d'explorer le polymorphisme aux différents niveaux (genre, espèce, souche). Ces techniques sont rapides et présentent une bonne reproductibilité.

Afin d'être le plus discriminant possible, il est nécessaire de choisir des régions cibles d'ADN, comportant des séquences conservées chez tous les micro-organismes, avec une variabilité spécifique pour un genre ou une espèce. Bien que l'ADNr 18S présente ces caractéristiques et permette de différencier des champignons de groupes taxonomiques différents, cette région ne semble pas appropriée pour une bonne différenciation des espèces au sein du même genre (Bruns *et al.*, 1991). La région ITS (Internal Transcribed Spacer) est préférentiellement utilisée par les taxonomistes pour l'identification des espèces fongiques (Bruns *et al.*, 1991 ; Hibbett *et al.*, 2005).

Plus récemment, d'autres régions cibles ont été utilisées pour une discrimination au sein de genres tels que *Penicillium* ou *Aspergillus* (Samson *et al.*, 2004a) ; notamment des séquences du gène de la  $\beta$ -tubuline, riches en introns ou le taux de variabilité semble approprié.

### 1. III. 2. 1. Généralités sur les tubulines

Les tubulines constituent une famille des protéines :  $\alpha$  (alpha)-,  $\beta$  (beta)-,  $\gamma$  (gamma)-,  $\delta$  (delta)-,  $\epsilon$  (epsilon)-,  $\zeta$  (zeta)- et  $\eta$  (eta)-tubulines (McKean *et al.*, 2001). Les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  sont les plus répandues dans les cellules eucaryotes car elles entrent dans la composition des microtubules. Ensemble, elles ont une masse moléculaire de 110 kDa. Les deux hétérodimères sont alignés avec une alternance  $\alpha\beta$  pour former des protofilaments (structures de base des microtubules) (Figure 11).

*Non libre de droit de diffusion*

**Figure 11.** Structure d'un microtubule

Les microtubules sont impliqués dans la mitose et participent à la structure des cils et des flagelles. Dans le compartiment cellulaire il existe une série des fibres qui contribuent à la forme et à la texture physique de la cellule, appelée cytosquelette. Parmi d'autres composés, celui-ci contient des microtubules. Les tubulines, protéines ubiquitaires de la cellule eucaryote, sont impliquées dans la division cellulaire, la motilité flagellaire et le transport intracellulaire des vésicules et des organites.

L'intérêt porté à ces protéines est dû à leur hétérogénéité dans la cellule et dans l'organisme, leur diversité étant liée aux différentes modifications post-traductionnelles.

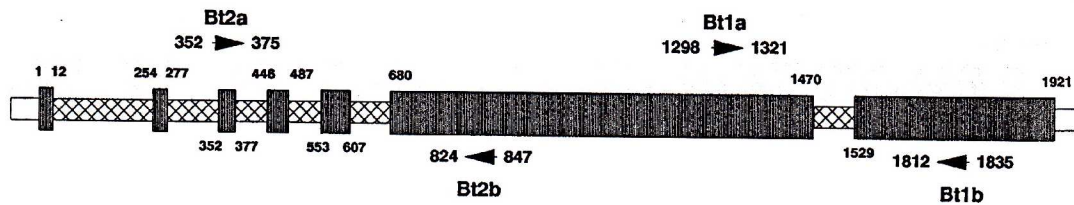
### 1. III. 2. 1. 1. Identification des moisissures par les $\beta$ -tubulines

La tubuline est considérée un élément clé dans la transition des procaryotes vers les eucaryotes (Wang *et al.*, 1999). van den Ent *et al.* (2001), ont mis en évidence un homologue de la tubuline chez les bactéries, ce qui place l'origine des tubulines avant la divergence des procaryotes et eucaryotes. Cette ancienneté nous fait supposer que le gène de la tubuline présente beaucoup de séquences divergentes, dû à une croissante variabilité sur une longue période d'évolution. Mais cela n'est pas le cas pour les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  car leur région N-terminale est très bien conservée (Little *et al.*, 1981). Les  $\beta$ -tubulines sont des marqueurs d'espèce en bonne corrélation avec les caractères phénotypiques (Samson *et al.*, 2004a).

Pour amplifier le gène de la  $\beta$ -tubuline, de nombreuses amorces sont disponibles dans la littérature. Glass *et* Donaldson (1995), ont construit plusieurs sets d'amorces sur la base de l'hybridation de l'ADN de *Neurospora crassa* et d'*Aspergillus nidulans* avec le génome de différents Ascomycètes et Deutéromycètes. Les amorces ont pour but d'amplifier des séquences qui contiennent plusieurs introns dans des gènes conservés. Parmi les couples d'amorces construits, seulement ceux provenant de *Neurospora crassa* ont amplifié des séquences d'ADN chez les Ascomycètes et les Deutéromycètes. Parmi les gènes cibles de *Neurospora crassa*, choisis pour l'hybridation, on note le gène de la  $\beta$ -tubuline (Figure 12), à partir du quel deux couples d'amorces ont été construits :

```
Bt1a 5' TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG 3'
Bt1b 5' GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC 3'
Bt2a 5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC 3'
Bt2b 5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3'
```

Le couple d'amorces Bt2a et Bt2b a été choisi pour notre identification car il permet, par analyse phylogénétique, une bonne discrimination du genre *Penicillium*, sous genre *Penicillium* (Samson *et al.*, 2004a).



**Figure 12.** Structure du gène de la  $\beta$ -tubuline de *Neurospora crassa* utilisée pour la recherche des amorces. Les segments rayés représentent les introns. Le couple Bt1a et Bt1b amplifient un fragment de 537 pb ; Bt2a et Bt2b un fragment de 495 pb ; d'après Glass *et* Donaldson, (1995)

## 1. IV. LE CUIVRE

Le carbone, l'oxygène, l'hydrogène, l'azote et les métaux, en quantité beaucoup plus faible que les éléments précédents, participent à la structuration des organismes vivants. Le cuivre est un élément essentiel pour tout être vivant. Il est souvent présent dans les aliments.

### 1. IV. 1. Le cuivre dans la vigne et le sol

Le cuivre a été majoritairement utilisé dans l'agriculture. Les premières données sur l'utilisation du cuivre en tant que fongicide datent de 1761 : la croissance des moisissures a été inhibée sur des graines aspergées avec une solution contenant du cuivre (Borkow *et* Gabbay, 2005). Une grande découverte a été faite en 1880 quand Alexis Millardet a inventé la « Bouillie Bordelaise » ( $\text{Ca(OH)}_2 + \text{CuSO}_4$ ), contre le « mildiou » (*Plasmopara viticola*). Elle contient 20 % de cuivre et on la dose généralement entre 10 et 20 g/L. L'innocuité de ce procédé fut démontrée par Ulysse Gayon à la même période. Peu de temps après cette découverte la « Bouillie de Bourgogne » ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{CuSO}_4$ ) analogue à la « Bouillie Bordelaise », a fait son apparition (Borkow *et* Gabay, 2005).

L'utilisation du cuivre pose des problèmes en ce qui concerne l'effet négatif sur l'environnement. Des fortes concentrations en cuivre sont négatives pour le développement de la vigne (Fleming *et* Trevors, 1989), pour le sol (Pietrzak *et* McPhail, 2004) ou pour l'eau (Cane *et* Watt, 2003). L'effet négatif du cuivre s'est élargi aussi à la santé humaine (Araya *et al.*, 2003).

La culture de la vigne, en Europe centrale est issue d'une tradition de plus de 2000 ans. La vigne, dont les fruits ne constituent pas la nourriture de base, est une culture essentielle, le pilier de la vie rurale. Le traitement au cuivre peut avoir une double action sur la vigne issue de porte-greffes d'origine américaine. Il permet à la fois de préserver la substance vitale en formation (synthèse des protéines à partir d'acides aminés libres et de composés azotés) de la plante, tout en détruisant les spores de champignon (Lundsgaard *et al.*, 2004).

Après le traitement de la plante avec la « Bouillie Bordelaise », en fonction des précipitations qui affectent les vignobles, une partie de cuivre est lessivée et peut s'accumuler dans le sol. Même si dans la viticulture biologique européenne les fongicides chimiques ne sont pas désirés, les produits à base de cuivre tels que le  $\text{Cu(OH)}_2$ ,  $3\text{Cu(OH)}_2 \cdot \text{CuCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$

et  $\text{Cu}_2\text{O}$ , sont indispensables et restent utilisés à des doses limitées, 8 kg  $\text{Cu}^{2+}$ /ha, quantité qui devrait diminuer à 6 kg  $\text{Cu}^{2+}$ /ha après quatre ans de culture (EC 473/2002 ; Komárek *et al.*, 2010). Il semble que le transport du cuivre par les racines, aux parties supérieures de la plante, ne soit pas important (Brun *et al.*, 2001).

La quantité de cuivre que l'on peut retrouver sur les raisins ou sur les feuilles représente le cuivre appliqué à une certaine période, qui n'a pas été lessivé par les précipitations. Ces quantités dépendent surtout du nombre de traitements et de la fréquence des précipitations. Les teneurs en cuivre, chez les plantes, sont en général comprises entre 2 et 20 mg/kg de matière sèche (Lundsgaard *et al.*, 2004). Le cuivre est assimilé sous forme de  $\text{Cu}^{2+}$ .

Les baies de raisins contiennent moins de cuivre par rapport au reste de la plante. Cela peut être dû à une plus petite surface de contact avec la « Bouillie Bordelaise ». Dans la littérature, les données sur la quantité de cuivre retrouvée sur les raisins ne sont pas nombreuses. Sur des raisins italiens blancs, la concentration en cuivre peut s'élever à 7,54 ppm (mg/kg), tandis que sur des raisins rouges la teneur en cuivre peut atteindre 11,32 ppm (García-Esparza *et al.*, 2006). Les mêmes expériences ont montré que les teneurs en cuivre de vins italiens allaient de 0,71 mg/L pour les rouges à 1,01 mg/L pour les blancs.

En ce qui concerne le sol, l'efficacité des traitements au cuivre est de plus en plus remise en question. Un des gros problèmes reste l'accumulation du cuivre dans le sol. S'il faut tenir compte de la teneur en cuivre dans le sol, on doit néanmoins considérer le type de composés qui y sont formés par le cuivre. Il apparaît que le cuivre est présent : pour 25 % à 75 % sous forme de liaisons organiques ; pour 15 % à 70 % sous forme de liaisons avec l'oxyde de manganèse et l'oxyde de fer ; et pour 1 à 10 % sous forme de liaisons siliceuses (Lundsgaard *et al.*, 2004). La solubilité du cuivre dans le sol dépend du pH. A un pH inférieur à 6, le cuivre est plus soluble et peut migrer plus facilement : ce qui peut poser des problèmes au niveau des réseaux phréatiques (Adriano, 2001). A des pH supérieurs à 7, la matière organique du sol est plus soluble, donc le cuivre peut former des complexes avec les différents composés présents (Arias *et al.*, 2006). La solubilité dans le sol, des composés à base de cuivre, décroît dans l'ordre :  $\text{CuCO}_3 > \text{Cu}_3(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2$  (azurite)  $> \text{Cu}(\text{OH})_2 > \text{Cu}_2(\text{OH}) > \text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$  (malachite)  $> \text{CuO}$  (tenorite)  $> \text{CuFe}_2\text{O}_4$  (ferrite cuprique). Dans le sol, le sulfate de cuivre est très soluble (Komárek *et al.*, 2010). Parmi les formes chimiques du cuivre, présentes dans le sol, l'ion  $\text{Cu}^{2+}$  est le plus toxique, comparativement aux formes  $\text{Cu}(\text{OH})^+/\text{Cu}(\text{OH})^2$  (Devez *et al.*, 2005). La teneur en cuivre, dans les sols non pollués, est en

général de l'ordre de 30 mg/kg (Adriano, 2001). Mais cette teneur peut atteindre 1000 mg/kg dans les sols pollués (Tableau 5).

**Tableau 5.** Concentration en cuivre dans les sols de vigne, d'après Komárek *et al.* (2010)

Pays	Profondeur (cm)	Cu (mg/kg)	Méthode utilisée
Australie	0-1	9-249	15.5 M HNO <sub>3</sub>
Australie	0-10	6-223	HNO <sub>3</sub> + HCl
Brésil	0-20	51-665	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + HClO <sub>4</sub> + HF
Brésil	0-5	37-3216	HNO <sub>3</sub> + HClO <sub>4</sub> + HF
Brésil	0-5	433-517	HNO <sub>3</sub> + HClO <sub>4</sub> + HF
Bulgarie	0-10	72	HNO <sub>3</sub> + HCl
Canada	0-15	10-77	HNO <sub>3</sub>
Croatie	0-20	105-553	HClO <sub>4</sub> + HNO <sub>3</sub> + HCl + HF
Croatie	0-10	30-700	HNO <sub>3</sub> + HCl
République Tchèque	0-20	20-168	O <sub>2</sub> + O <sub>3</sub> + NO <sub>x</sub> 400 °C + HNO <sub>3</sub> + HF
France	0-10	248-378	HClO <sub>4</sub> + HF
France	0-15	14-251	HNO <sub>3</sub> + HCl
France	0-15	158	HNO <sub>3</sub> + HCl
France	2-15	144	HClO <sub>4</sub> + HF
France	0-30	22-398	HClO <sub>4</sub> + HF
France	5-10	232	HNO <sub>3</sub> + HCl + HF
France	0-10	17-34 <sup>a</sup>	HClO <sub>4</sub> + HF
France	0-2	323	HF
France	0-10	15-430	HClO <sub>4</sub> + HF
France	n.a.	32-184 (1030) <sup>b</sup>	HClO <sub>4</sub> + HF
France	0-20	57-332	LiBO <sub>2</sub> , 550 °C + HNO <sub>3</sub>
France	0-10	89-243	HNO <sub>3</sub>
France	0-25	55-115	HClO <sub>4</sub> + HCl + HF
Georgia	AB horizons	137-398	HNO <sub>3</sub> + HCl
Grèce	0-30	< 157	HNO <sub>3</sub> + HCl
Italie	0-15	50-300 <sup>c</sup>	HNO <sub>3</sub> + HClO <sub>4</sub>
Italie	0-30	183	n.a.
Italie	n.a.	215-372	HNO <sub>3</sub> + HCl
Italie	0-10	< 945	HNO <sub>3</sub> + HCl
Italie	n.a.	125-155 <sup>c</sup>	HNO <sub>3</sub> + HClO <sub>4</sub>
Moldovie	Surface	< 250	n.a.
Nouvelle Zélande	0-10	4-259 (304) <sup>d</sup>	HNO <sub>3</sub> + HCl
Portugal	0-30	58-130	n.a.
Slovénie	0-20	163	n.a.
Slovénie	0-45	364	n.a.
Slovénie	0-20	65-99	HNO <sub>3</sub> + HCl
Slovénie	0-20	87-120	HNO <sub>3</sub> + HCl
Espagne	0-20	40-301	HNO <sub>3</sub> + HCl + HF
Espagne	0-20	179-549	HNO <sub>3</sub> + HCl + HF
Espagne	0-20	60-560	HNO <sub>3</sub> + HCl + HF
Espagne	0-20	35-550	HNO <sub>3</sub> + HCl + HF
Espagne	0-5	42-583	HNO <sub>3</sub> + HCl + HF
Espagne	0-20	79-130	HNO <sub>3</sub> + HCl + HF
Espagne	0-20	25-272	HNO <sub>3</sub> + HCl + HF
Espagne	0-20	61-434	HNO <sub>3</sub> + HCl + HF
Espagne	0-20	55-112	HNO <sub>3</sub> + HCl + HF
Espagne	0-10	125-603	HNO <sub>3</sub> + HCl + HF
Espagne	0-5	42-583	HNO <sub>3</sub> + HCl + HF
Espagne	0-20	38-63	HNO <sub>3</sub> + HCl
Suisse	n.a.	58-489	2 M HNO <sub>3</sub>
Thaïlande	0-10	115-238	Rayons X

<sup>a</sup>un vignoble nouvellement planté ; <sup>b</sup>contamination localisée aux déversements occasionnels de fongicides ; <sup>c</sup>valeurs approximatives estimées à partir des figures ; <sup>d</sup>vigne dans l'ancien verger.



En Australie, sur 14 parcelles de sol de vigne testées, 8 ont présenté des concentrations en cuivre supérieures aux concentrations autorisées (60 mg/kg), certaines allant même jusqu'à 250 mg/kg de cuivre (Pietrzak *et* McPhail, 2004).

Sur des échantillons de terre prélevés en Bourgogne en 2002, Parat *et al.* ont dosé le cuivre jusqu'à 300 mg/kg de sol. La valeur maximale tolérée par l'Union Européenne, pour les terres agricoles, est de 150 mg de cuivre/kg de matière sèche. Entre 50 et 150 mg/kg, la situation est déjà délicate, mais encore acceptable (Lundsgaard *et al.*, 2004).

Le cuivre qui s'accumule au niveau du sol a des effets sur la plante et sur la santé humaine mais il ne faut pas oublier le but pour lequel il est utilisé ; son effet négatif sur le développement des microorganismes et, plus particulièrement, sur les moisissures de la vigne.

#### **1. IV. 2. L'utilisation du cuivre contre les microorganismes**

Dans l'Antiquité les Egyptiens utilisaient déjà le cuivre pour « stériliser » l'eau et les plaies. Dans plusieurs domaines, on retrouve l'addition de cuivre afin d'empêcher la croissance microbienne.

La « Bouillie Bordelaise », produit phytosanitaire depuis 1880, est utilisée dans le but de contrôler principalement la maladie fongique de la vigne due au 'mildiou' (*Plasmopara viticola*) (Figure 13). Le 'mildiou' est le nom francisé de l'expression anglaise 'mildew', nom générique donné à une série de maladies cryptogamiques de nombreuses plantes. Sur les feuilles tombées au sol, *Plasmopara viticola* se maintient principalement sous forme d'oospores.

Ces oospores arrivent à maturité durant le printemps, germent et émettent des zoospores qui vont aller contaminer les jeunes organes de la vigne.

*Non libre de droit de diffusion*

**Figure 13.** Feuille de vigne parasitée par le mildiou

Les données sur l'effet antifongique du cuivre sont nombreuses dans la littérature. A des concentrations supérieures à 0,4 µg/mL, le cuivre-8-quinolinolate a une action fongicide contre *Aspergillus sp.* qui cause des infections aux patients immunodépresseurs, d'où son utilisation dans les hopitaux (Gershon *et al.*, 1989). Le cuivre est efficace aussi contre une infection fongique des pieds appelé « *tinea pedis* » (causé généralement par *Tricophyton sp.*). Cette infection est résistante au traitement et peut se répandre sur d'autres parties du corps. Des chaussettes imprégnées avec une solution de cuivre peuvent être utiles dans le traitement de cette infection (Zatcoff *et al.*, 2008).

Le cuivre est un des composés des surfaces de travail dans l'industrie agroalimentaire car il empêche la croissance de *Salmonella enterica* et *Campylobacter jejuni* (Faundez *et al.*, 2004). Les systèmes de distribution d'eau potable qui contiennent du cuivre ont un plus grand potentiel de limitation de la croissance de *Legionella pneumophila* que les tubages systèmes en alliage ferreux ou en plastique (Borkow *et Gabbay*, 2005). Si les composés antibactériens sont mélangés avec du cuivre leur effet augmente (Sau *et al.*, 2003).

Le cuivre, à des concentrations de 0,16 mM à 1,6 mM peut inactiver jusqu'à 50 %, le virus de l'immunodéficience humaine (HIV-1). L'inactivation passe par la dégradation de l'ARN. Afin que l'ARN du virus puisse être attaqué par le cuivre la capsid doit d'abord être coupée. Des agents oxydants sont impliqués dans la dégradation de la capsid afin que l'ARN soit dénaturé par le cuivre (Borkow *et Gabbay*, 2005).

Le sulfate de cuivre est également utilisé pour le contrôle des écumes d'algues dans les étangs de ferme, les champs de riz, les canaux d'irrigation et de drainage, les rivières, les lacs et les piscines. Depuis 1838 il est efficace pour préserver le bois. Le cuivre agit contre les serpents dans les eaux à différents niveaux d'alcalinité (Borkow *et Gabbay*, 2005).

### **1. IV. 3. Facteurs qui peuvent influencer la biodisponibilité du cuivre**

Avant de comprendre les mécanismes de toxicité du cuivre sur la cellule, il faut d'abord mentionner les facteurs qui peuvent influencer la biodisponibilité du cuivre. Gadd *et Griffiths* (1978) ont mis en évidence les facteurs qui peuvent influencer la toxicité des

métaux. Dans le sol, le métal peut être lié à différents composés tels que l'acide humique ou l'argile. Cet état peut diminuer la toxicité du métal.

Des composés tels que le citrate, la cystéine, le glutamate ou l'EDTA peuvent aussi diminuer les effets toxiques d'un métal, quand ils sont ajoutés à un milieu de culture. En présence du citrate, *Aerobacter aerogenes* a pu se développer à 200 ppm de cadmium, tandis qu'en présence de glucose, aucune croissance n'a été détectée (Pickett *et* Dean, 1976). La liaison du cuivre avec ces composés est une explication à la diminution de la toxicité du métal.

Le pH a un rôle important dans la biodisponibilité du métal. À un pH acide les métaux sont à l'état de cations libres tandis qu'à un pH alcalin les cations précipitent sous la forme d'oxydes ou d'hydroxydes insolubles. Le pH auquel les métaux précipitent dépend du métal et de ses états d'oxydation. L'état oxydé du cuivre est favorisé par un pH élevé. Généralement, un pH bas va augmenter la disponibilité des ions métalliques.

Autres conditions à prendre en compte, ce sont les interactions entre les ions. Paton *et* Budd (1972) ont montré que l'assimilation du zinc par *Neocosmospora vasinfecta* est influencée par les ions de magnésium qui agissent en tant qu'inhibiteurs compétitifs. L'assimilation du cobalt par *Neurospora crassa* est aussi inhibée par le magnésium (Venkateswerlu *et* Sastry, 1970).

Chez *Trichoderma viride*, la bioaccumulation du cuivre dépend fortement de la température et du pH, les conditions optimales étant 30°C et pH 5. Les concentrations inhibitrices diffèrent d'un milieu à l'autre. La teneur en cuivre tolérée pour la croissance de *Trichoderma* 5000 mg/L de Cu (II) sur un milieu solide tandis que sur un milieu liquide (plus grande biodisponibilité du cuivre) la concentration maximale tolérée est de 200 mg/L (Anand *et al.*, 2006). La culture en milieu liquide d'*Acremonium pinkertoniae*, aux mêmes concentrations en cuivre, conduit à une plus faible accumulation de cuivre par le mycélium (Zapotoczny *et al.*, 2007). Parmi différentes sources de cuivre utilisées (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, CuCl<sub>2</sub>, Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> et CuCO<sub>3</sub>) seul le CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O a contribué à la production maximale d'acide citrique par *Aspergillus niger* grâce au fait que le sulfate de cuivre libère le plus d'ions de Cu(II) (Haq *et al.*, 2002).

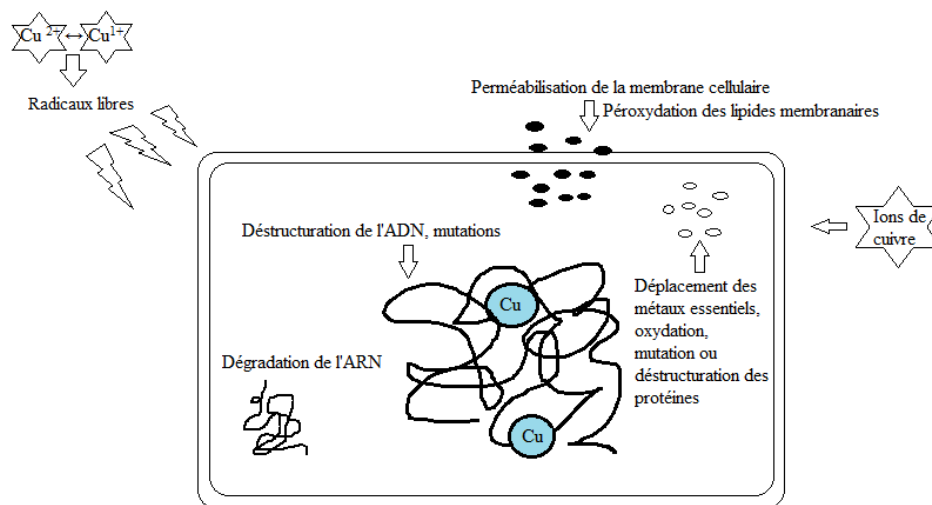
De tout cela, on peut déduire que la biodisponibilité du cuivre dépend de nombreux facteurs, qu'elle est propre à chaque situation (ensemble des conditions environnementales : composition du milieu, température, pH, a<sub>w</sub>, ...) et varie suivant le type de microorganisme.

Parfois tous ces facteurs peuvent avoir l'effet inverse, augmenter la toxicité du métal (Gadd *et* Griffiths, 1978).

#### 1. IV. 4. Mécanismes de toxicité du cuivre

Les métaux, à des concentrations élevées, sont toxiques pour les organismes. Il existe plusieurs types de mécanismes de toxicité du cuivre :

- le cuivre interagit avec les acides nucléiques et dénature leur structure hélicoïdale ;
- le potentiel d'oxydoréduction du cuivre ( $\text{Cu}^{+2} \leftrightarrow \text{Cu}^{+1}$ ) catalyse la production de radicaux libres qui peuvent dénaturer protéines, lipides et autres bio-molécules ;
- le cuivre peut intervenir dans le déplacement des métaux essentiels de leurs sites d'action, ce qui conduit à l'oxydation, la mutation ou la dénaturation des protéines (Borkow *et* Gabbay, 2005) (Figure 14).



**Figure 14.** Les mécanismes de toxicité du cuivre au niveau de la cellule, d'après Borkow *et* Gabbay (2005)

La première structure sur laquelle le cuivre agit au niveau de la cellule, c'est la membrane cellulaire. Il a été montré que l'exposition de moisissures et de levures à des concentrations élevées en cuivre, dénature l'intégralité de leurs membranes cellulaires ce qui entraîne la perte des solutés et la mort (Cervantes *et* Gutierrez-Corona, 1994). 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuCl}_2$  peuvent causer une diminution de perméabilité de la membrane cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* en moins de 2 min à 25 °C (Saitoh *et al.*, 2009). Le cuivre peut

former des liaisons électrostatiques avec des régions chargées négativement de la membrane cellulaire du microorganisme.

La composition en lipides semble jouer un rôle important dans le mécanisme de toxicité du cuivre. Les membranes cellulaires des microorganismes diffèrent par leurs compositions en lipides. Cela implique donc un niveau de résistance différent pour chaque microorganisme. Dans des cultures enrichies avec des acides gras polyinsaturés, la perméabilité de la membrane cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* et la toxicité qui en découle sont considérablement accrues en présence de cuivre, par rapport à des cellules témoin (Avery *et al.*, 1996).

Une fois que le cuivre est entré dans la cellule, il peut dénaturer l'ADN. Les études montrent que la double hélice de l'ADN contient au moins deux types de sites de liaison pour le cuivre. Le premier site est présent tous les quatre nucléotides et a une grande affinité pour le cuivre, le deuxième, saturable avec une  $K_d = 41 \mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$ , est un site intercalé présent sur chaque nucléotide (Borkow *et Gabbay*, 2005). Le cuivre peut aussi altérer le fonctionnement des enzymes.

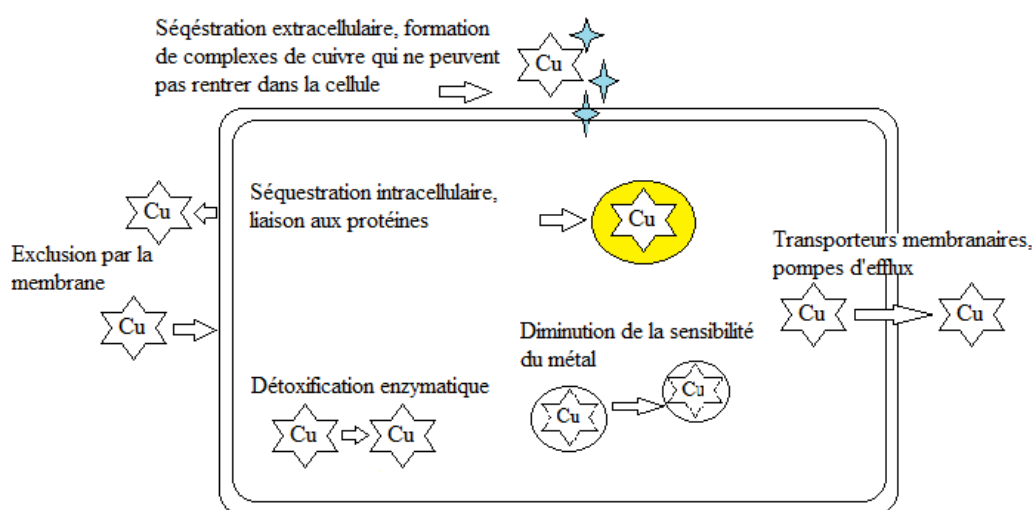
## **1. IV. 5. Mécanismes de résistance au cuivre**

### **1. IV. 5. 1. Généralités**

La résistance est définie comme la capacité d'un microorganisme de survivre à une certaine concentration d'un métal, par le biais d'un mécanisme développé comme réponse directe à la toxicité.

A partir d'une certaine concentration (dite 'toxique'), pour survivre, la cellule doit absolument développer des mécanismes de résistance à certains métaux. Ces mécanismes sont en relation avec un métal donné, mais ne sont pas automatiquement capables de permettre la survie en présence d'un autre métal. Cela peut dépendre de facteurs environnementaux. Néanmoins, d'un point de vue général, les métaux qui deviennent toxiques pour les microorganismes constituent aussi une part de leurs micronutriments essentiels.

Les concentrations en cuivre nécessaires au développement de microorganismes sont ainsi de l'ordre de 1 à 10  $\mu\text{M}$  (Cervantes *et Gutierrez-Corona*, 1994).



**Figure 15.** Les mécanismes de résistance au cuivre développés par la cellule, d'après Borkow *et* Gabbay (2005)

#### 1. IV. 5. 2. La résistance au cuivre des bactéries

Les mécanismes de résistance au cuivre, connus chez les bactéries, incluent : l'exclusion par la membrane cellulaire, la séquestration intra ou extracellulaire, l'efflux membranaire actif, la détoxification enzymatique, la réduction de la sensibilité des composés cellulaires aux ions métalliques (Borkow *et* Gabbay, 2005).

##### *L'exclusion par la membrane cellulaire*

Une fois entré dans la cellule, en fonction de sa concentration, le cuivre devient toxique : des altérations de la membrane cellulaire augmentent sa perméabilité et, donc, participent à l'exclusion du métal. Les bactéries sont aussi capables de former une enveloppe de nature polysaccharidique pour se protéger de la toxicité du métal. Ce mécanisme a été mis en évidence chez *Klebsiella aerogenes* pour se défendre des concentrations excessives de cadmium (Scott *et* Palmer, 1990).

Les études génétiques menées sur les bactéries, ont mis en évidence l'existence d'un opéron de quatre gènes *copA*, *copB*, *copC* et *copD*, chez *Pseudomonas sp.*, qui intervient dans la liaison du cuivre au périplasma (Cooksey, 1994).

### ***La séquestration intra- et extracellulaire***

Dans la cellule, des protéines spécifiques peuvent former des complexes avec le métal. Dans le cas de *Synechococcus sp.*, le gène *smtA*, présent chez cette bactérie, code pour une métallothionéine (protéine riche en cystéine) qui se lie au métal, seulement en présence de fortes quantités de cuivre, de cadmium ou de zinc (Rouch, 1995).

La séquestration extracellulaire a été plutôt décrite chez les levures et les moisissures.

### ***Le transport actif à l'extérieur de la cellule***

Les bactéries sont capables de développer des mécanismes de résistance qui impliquent le transport actif du métal, du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule. Le transport est mis en place grâce aux mécanismes d'efflux de l'ATPase (Saitoh *et al.*, 2009).

### ***La détoxification enzymatique***

Chez *Pseudomonas synxantha*, en aérobiose ou en anaérobiose, le  $\text{Cr}^{+6}$  toxique est réduit en  $\text{Cr}^{+3}$ , un précipité insoluble, Une enzyme soluble contenue dans la cellule intervient dans cette réduction (Borkow *et Gabbay*, 2005).

### ***La réduction de la sensibilité au métal***

Dans le but de diminuer la sensibilité au métal, des mutations peuvent intervenir dans la cellule bactérienne et cela n'altère pas les fonctions cellulaires. La cellule est aussi capable d'alterner les différentes voies dans son métabolisme pour contourner les composants sensibles. Le microorganisme peut se défendre par la production de composés résistants au métal (Borkow *et Gabbay*, 2005).

Les mécanismes de réparation de l'ADN peuvent aussi protéger la cellule de l'effet négatif du métal. Cela a été montré dans le cas du cadmium, l'ADN d'*Escherichia coli* en présence de ce métal a souffert d'altérations. Après subculture, toujours en présence de cadmium, le microorganisme développe une résistance ; et l'augmentation de la phase de latence pour la croissance est considérée comme une période nécessaire pour réparer l'ADN endommagé (Borkow *et Gabbay*, 2005).

## **1. IV. 5. 3. La résistance au cuivre des champignons**

Par rapport aux bactéries, les champignons présentent des similarités, mais aussi des différences, au niveau des mécanismes de résistance au cuivre. En liaison avec la complexité

de la cellule eucaryote, des levures (*Rhodotorula*) et des moisissures (*Penicillium*, *Trichoderma*, et *Mucor*), isolées de sites contaminés, sont résistantes au cuivre grâce à leurs propriétés intrinsèques et non pas à l'adaptation (Arnebrant *et al.*, 1987).

Les mécanismes de résistance au cuivre des moisissures incluent : la liaison par la paroi cellulaire, l'assimilation du métal par la cellule, la chélation intra ou extracellulaire (Cervantes *et Gutierrez-Corona*, 1994).

### ***La liaison par la paroi cellulaire***

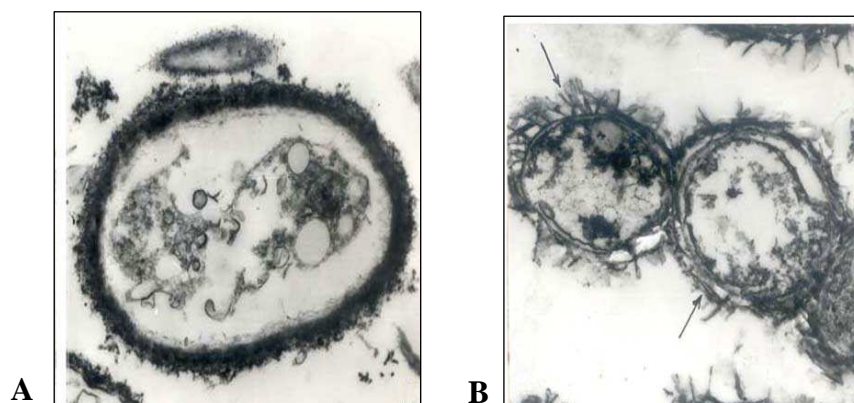
Pour se protéger de l'effet toxique du cuivre, les moisissures peuvent adsorber le métal à la paroi cellulaire. Cette paroi est constituée de polysaccharides tels que le chitosan et la chitine. La liaison du cuivre aux composants de la paroi est un processus rapide (de l'ordre de quelques minutes) qui a été mis en évidence chez *Candida utilis* (Khovrychev, 1973).

*Rhizopus stolonifer* et *Cunninghamella blakesleeana* sont des souches considérées comme résistantes au cuivre, car, au niveau de leur mycélium, elles accumulent davantage de cuivre que des souches sensibles (Garcia-Toledo *et al.*, 1985). Cela est dû au fait que leur paroi contient une plus forte proportion de chitosan (Bartnicki-Garcia, 1968).

Ce type de mécanisme a aussi été décrit chez *Acremonium pinkertoniae* (Zapotoczny *et al.*, 2007), espèce qui peut accumuler le cuivre, jusqu'à 20 % de son poids sec. Par formation de liaisons avec les atomes d'azote et d'oxygène des amides et les radicaux hydroxyyles des polysaccharides, les ions cuivre sont incorporés dans le complexe glucane-chitine de la paroi. Cette moisissure, cultivée dans des milieux à fortes concentrations en cuivre, développe (dès 100 mg de cuivre/kg de milieu) une biomasse de couleur bleue. Le mycélium, très condensé et peu cloisonné, devient bleu : les hyphes gonflent, la paroi voit son épaisseur initiale multipliée jusqu'à 7 fois. Quand les hyphes atteignent 50 µm d'épaisseur, les structures métallo-cristalloïdiques de la paroi d'*Acremonium pinkertoniae* deviennent visibles. A partir de 150 mg de cuivre /kg de milieu solide, il n'y a plus de formation de conidies.

En présence d'une concentration en  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  de 100 mg/L de milieu, la biomasse de *Trichoderma viride* (3,4 g) accumule 81 % du cuivre en 72h. Les observations microscopiques ont montré que le cuivre forme une couche à la surface de la paroi cellulaire (Figure 16) (Anand *et al.*, 2006).





**Figure 16.** Images au microscope électronique des cellules de *Trichoderma viride*, A-témoin, B-cuivre à la surface de la cellule, d'après Anand *et al.* (2006)

*Mucor rouxii* accumule du cuivre sur la paroi cellulaire mais aussi à l'intérieur de la cellule. Les souches résistantes au cuivre sont capables d'accumuler 10 fois plus de cuivre que la souche témoin. Dans le cas de cette espèce, le cytosol joue un rôle important dans la résistance au cuivre, mais quand la concentration du métal augmente fortement, c'est la paroi cellulaire qui accumule le plus de cuivre (Ramirez-Salgado *et al.*, 1996) (Tableau 6).

**Tableau 6.** Cuivre retrouvé dans les fractions cellulaires de la souche sensible (IM-80) et celles résistantes (P1 et P3) au cuivre, de *Mucor rouxii*, d'après Ramirez-Salgado *et al.* (1996)

Souche	Cuivre récupéré (nmol/mg poids sec)	
	Paroi cellulaire	Cytosol et membranes
Culture dans 1,6 $\mu$ M CuSO <sub>4</sub>		
IM-80	0,30 $\pm$ 0,05	0,20 $\pm$ 0,03
P1	3,40 $\pm$ 0,40	3,00 $\pm$ 0,35
P3	2,80 $\pm$ 0,50	2,10 $\pm$ 0,30
Culture dans 3,2 $\mu$ M CuSO <sub>4</sub>		
IM-80	42,60 $\pm$ 5,00	38,60 $\pm$ 4,50
P1	77,50 $\pm$ 9,00	59,70 $\pm$ 8,00
P3	65,00 $\pm$ 8,00	53,30 $\pm$ 7,00

### *L'assimilation dans la cellule*

Peu d'informations existent sur l'assimilation et le transport du cuivre à l'intérieur de la cellule, en raison d'un manque de radio-isotope approprié du cuivre (Cervantes *et* Gutierrez-Corona, 1994). L'assimilation du cuivre dans la cellule est plus lente que l'intégration à la

paroi cellulaire. Les températures basses, les analogues du glucose ou le pH acide peuvent inhiber ce processus d'internalisation du cuivre (Gadd, 1986). Une fois que le cuivre est assimilé dans la cellule, il est possible qu'il se dépose aussi sur la paroi des organites intracellulaires.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'assimilation du cuivre peut être inhibée par le potassium dans un rapport stœchiométrique d'une mole de cuivre pour deux moles de potassium (De Rome *et Gadd*, 1987).

Phelan *et al.* (1990) ont montré que la résistance au cuivre d'*Aspergillus nidulans* est due à la mutation d'un gène dont deux loci différents ont été décrits, *cupA* et *cupB*. Le mécanisme lié à ces gènes est expliqué par la restriction de l'assimilation du cuivre par la cellule, car la germination ne semble pas affectée par le cuivre. Néanmoins, pour élucider le mécanisme exact de l'assimilation, de fortes concentrations en cuivre doivent être testées, ce qui n'a pas encore été le cas pour *A. nidulans*.

L'imperméabilité membranaire qui peut se traduire par une restriction de l'assimilation du cuivre semble expliquer la résistance à ce métal pour le genre *Penicillium* (Basu *et al.*, 1955).

### ***La formation des chélates intra- et extracellulaires***

Pour résister aux fortes concentrations en cuivre, les moisissures peuvent former des métallothionéines (protéines riches en cystéine). Ce type de mécanisme a été étudié, en profondeur, par biologie moléculaire. Les études menées par Brenes-Pomales *et al.* (1955), ont mis en évidence l'existence d'un gène appelé *CUP1* associé à la résistance au cuivre chez *Saccharomyces cerevisiae*. L'expression de ce gène dépend d'un facteur de transcription ACE1 codé par le gène *CUP2*. La partie N-terminale du ACE1 contient des résidus de cystéine qui forment des thiolates de cuivre. *Mucor rouxii* contient des séquences d'ADN homologues à la séquence *CUP* de *Saccharomyces cerevisiae*, mais leur rôle dans la résistance au cuivre n'a pas encore été élucidé (Ramírez-Salgado *et al.*, 1996).

Les microorganismes peuvent produire du H<sub>2</sub>S qui peut former des composés insolubles avec le métal (Gadd *et Griffiths*, 1978).

Les moisissures résistantes au cuivre produisent des oxalates qui peuvent précipiter le métal par la formation des cristaux d'oxalate de cuivre (Borkow *et Gabbay*, 2005). *Postia*, *Wolfiporia*, *Meruliporia*, *Gloeophyllum*, *Laetiporus*, *Coniophora*, *Antrodia*, *Serpula* et *Tyromyces* produisent de l'acide oxalique, comme mécanisme de résistance au cuivre

(Borkow *et* Gabbay, 2005). La chélation du cuivre par l'acide oxalique pose un problème pour la préservation du bois.

#### ***Autres mécanismes de résistances***

La production d'acide citrique est aussi une réponse de la moisissure envers la toxicité du cuivre. Le cuivre augmente la production d'acide citrique par *Aspergillus niger* (Haq *et al.*, 2002).

Chez *Botrytis cinerea*, des ATPases impliquées dans le transport intracellulaire du cuivre, en particulier vers les protéines, ont été mises en évidence (Saitoh *et al.*, 2009).

Par des mécanismes qui n'ont pas encore été élucidés, *P. expansum* produit plus de biomasse, de spores et de géosmine, en présence du cuivre. Le cuivre n'est pas accumulé par les cellules de *P. expansum* tandis que, parmi d'autres métaux testés, le cobalt est accumulé par la moisissure, mais sans qu'il induise le même défaut organoleptique que le cuivre (Dionigi *et al.*, 1996). A la différence d'autres métaux, il est possible que le cuivre active certains processus métaboliques chez *P. expansum* et que les mécanismes de résistance soient développés seulement à partir d'une certaine concentration.

#### **1. IV. 5. 4. Quelques données sur la résistance des moisissures aux métaux**

En Inde, sur des sols contaminés par des métaux lourds véhiculés par des eaux usées, des moisissures des genres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Monilia*, *Rhizopus* et *Trichoderma* ont été isolées. Elles peuvent faire partie des microorganismes tolérants aux métaux lourds. Néanmoins, la tolérance aux métaux chez les moisissures dépend de l'isolat, mais aussi du métal.

On note que les concentrations minimales inhibitrices de certains métaux peuvent globalement se hiérarchiser de manière suivante : Cu > Cr > Cd > Co > Ni (Zafar *et al.*, 2007) (Tableau 7).

On en conclut alors que la variation de la tolérance à un métal ou à un autre peut être due aux différents mécanismes de résistance développés et aussi aux nécessités de la cellule (des protéines) pour un métal donné.

La résistance microbienne au cuivre est un phénomène complexe : il y a beaucoup d'interactions à prendre en compte entre microorganisme et environnement. Il est évident que

la résistance observée dans les conditions du laboratoire n'est pas toujours comparable avec la résistance « au champ » en raison de nombreux facteurs qui peuvent y intervenir.

**Tableau 7.** Concentrations inhibitrices des différents métaux, d'après Zafar *et al.* (2007)

Souche	Concentration minimale inhibitrice (MIC) (mg/mL)				
	Cobalt	Chrome	Cuivre	Cadmium	Nickel
<i>Alternaria</i> sp.	1,0	0,9	<b>2,0</b>	1,0	0,9
<i>Aspergillus</i> sp.1	0,7	0,9	<b>2,0</b>	0,7	0,6
<i>Aspergillus</i> sp.2	3,0	5,0	<b>4,0</b>	4,0	2,0
<i>Fusarium</i> sp.	2,0	5,0	<b>3,0</b>	3,0	1,0
<i>Geotrichum</i> sp.	0,1	0,6	<b>0,7</b>	0,2	0,1
<i>Monilia</i> sp.	0,1	0,3	<b>0,6</b>	0,3	0,2
<i>Penicillium</i> sp.	5,0	7,0	<b>8,0</b>	5,0	4,0
<i>Rhizopus</i> sp.	5,0	7,0	<b>9,0</b>	5,0	3,0
<i>Trichoderma</i> sp.	4,0	6,0	<b>4,0</b>	3,0	3,0

L'étude des moisissures tolérantes au cuivre peut déboucher sur des applications : ces moisissures peuvent être utilisées dans des systèmes de détoxification et donc de récupération des métaux (par lixiviation) ou dans la sélection de nouveaux composés fongicides.

## 1. V. MODELISATION DE LA CROISSANCE FONGIQUE

Aujourd'hui, un grand intérêt est porté à la maîtrise de la contamination des produits alimentaires par les moisissures. Cela est dû à l'apparition continue des nouveaux produits et des procédés de fabrication et de conservation. Pour assurer une sécurité des aliments qui peut répondre aux attentes des consommateurs, les matières premières et les produits alimentaires obtenus doivent présenter le risque microbiologique le plus faible. Dans des conditions favorables, les moisissures se développent et produisent un grand nombre des métabolites secondaires. Le problème pour certaines, est la production des mycotoxines. Cela conduit donc à des pertes économiques pour les agriculteurs et les industriels et représente un danger pour la santé des consommateurs (Dantigny, 2004).

La mycologie prévisionnelle a pour but de prédire le développement des moisissures dans les produits alimentaires contaminés (Dantigny *et al.*, 2003). La vitesse de développement des microorganismes est évaluée par l'élaboration des modèles mathématiques.

Un produit alimentaire est contaminé au moment où l'on commence à voir les hyphes. Pour empêcher le développement de la moisissure et l'altération des aliments, les études doivent se centrer sur les effets de la variation des différents facteurs environnementaux, comme l'activité de l'eau, la température et le pH, sur la germination et la croissance.

On distingue deux types de modèles : d'une part, les modèles primaires, qui décrivent la cinétique d'évolution ( $y=f(t)$ ) d'une population de microorganismes dans un environnement donné ; d'autre part, les modèles secondaires, qui décrivent les effets de facteurs environnementaux sur les paramètres des modèles primaires.

### 1. V. 1. Modèles primaires

Les paramètres biologiques tels que le temps de germination ou le taux de croissance radiale, sont calculés à l'aide de différentes équations (Dantigny *et al.*, 2006a, 2006b). La distribution du taux de croissance radiale et du temps de latence des spores individuelles nous apportent des informations sur le développement d'une moisissure (Simbarache, 2006).

### 1. V. 1. 1. Modèles de germination

Les spores doivent être examinées à des intervalles de temps réguliers afin de construire une courbe de germination :  $P (\%) = f (t)$  (Dantigny *et al.*, 2003) :

#### Le modèle de Gompertz :

$$P = A \exp (-\exp [(\mu_m e (1)/A) (\lambda_{ge} - t) + 1]) \quad (1)$$

où A (%) représente la valeur de P asymptotique pour  $t \rightarrow +\infty$  ;  $\mu_m (h^{-1})$  est la pente de la ligne tangente qui passe par le point d'inflexion ( $t_i$ ) ;  $\lambda_{ge} (h)$  est l'axe de t interceptée par la tangente et t (h) le temps. Le point d'inflexion est défini par la formule :  $t_i = \delta + A / (\mu_m e (1))$ .

#### Le modèle logistique :

$$P = P_{max} / 1 + \exp [k (\tau - t)] \quad (2)$$

où  $P_{max} (\%)$  est la valeur de P asymptotique pour  $t \rightarrow +\infty$  ; k ( $h^{-1}$ ) est la pente de la ligne tangente qui passe par le point d'inflexion ;  $\tau (h)$  représente le point d'inflexion où P est la moitié de  $P_{max}$  et t (h) le temps.

Le modèle logistique est symétrique par rapport au point d'inflexion, contrairement au modèle de Gompertz (Dantigny *et al.*, 2006b).

#### Le modèle asymétrique :

$$P = P_{max} (1 - (1 / (1 + (t/\tau)^d))) \quad (3)$$

où  $P_{max} (\%)$  est la valeur de P asymptotique pour  $t \rightarrow +\infty$  ;  $\tau (h)$  est le temps de germination et d, un paramètre de conception.

Ce modèle est dérivé du modèle d'inhibition non-compétitive décrit par Yano *et Koga* (1973) et permet de décrire tous les types de courbes de germination (Dantigny *et al.*, 2011), par conséquent il peut remplacer le modèle de Gompertz et le modèle logistique.

### 1. V. 1. 2. Modèles de croissance

Après la germination des spores, des mycéliums sont visibles à l'œil nu. Le suivi de la croissance fongique est alors assuré par la mesure du diamètre de la colonie. Un modèle primaire a été adapté aux champignons pour suivre la croissance (Barayni *et al.*, 1993). Une équation linéaire a permis l'estimation de la croissance radiale des colonies des champignons de manière plus précise.

$$r = \mu (t-l) \quad (4)$$

où  $r$  (mm) est le rayon de la colonie ;  $l$  (h) le temps de latence et  $\mu$  (mm/j) le taux de croissance radiale de la colonie ; elle est définie comme étant la pente de la courbe.

### 1. V. 2. Modèles secondaires

Parmi les facteurs environnementaux, l' $a_w$  et la température ont la plus grande influence sur la croissance des moisissures (Dantigny *et al.*, 2005a).

#### 1. V. 2. 1. Modèles cardinaux

Les modèles cardinaux sont nés sur la base de deux critères : un minimum de paramètres avec une signification commune pour les microbiologistes (critère de parcimonie), obtention des résultats réels sur le domaine d'étude choisi (critère de consistance). Le premier facteur intégré dans ce modèle a été la température (Rosso, 1993).

Le modèle **température** montre la relation entre le taux de croissance et la température ( $\mu = f(T)$ ) :

$$\mu = \frac{\mu_{\text{opt}}(T_{\text{min}} - T_{\text{max}})(T - T_{\text{min}})^2}{(T_{\text{opt}} - T_{\text{min}})[(T_{\text{opt}} - T_{\text{min}})(T - T_{\text{opt}}) - (T_{\text{opt}} - T_{\text{max}})(T_{\text{opt}} + T_{\text{min}} - 2T)]} \quad (5)$$

où  $\mu_{\text{opt}}$  (mm/j) représente le taux de croissance pour  $T = T_{\text{opt}}$  ;  $T_{\text{min}}$ ,  $T_{\text{opt}}$  et  $T_{\text{max}}$  (°C) ce sont les températures cardinales.

Le modèle **activité de l'eau** a été adapté par Sautour *et al.* (2001a), pour décrire la relation entre le taux de croissance et l'activité de l'eau ( $\mu = f(a_w)$ ) :

$$\mu = \frac{\mu_{\text{opt}}(a_{\text{wmin}} - a_{\text{wmax}})(a_{\text{w}} - a_{\text{wmin}})^2}{(a_{\text{wopt}} - a_{\text{wmin}})[(a_{\text{wopt}} - a_{\text{wmin}})(a_{\text{w}} - a_{\text{wopt}}) - (a_{\text{wopt}} - a_{\text{wmax}})(a_{\text{wopt}} + a_{\text{wmin}} - 2a_{\text{w}})]} \quad (6)$$

où  $\mu_{\text{opt}}$  (mm/j) représente le taux de croissance pour  $a_{\text{w}} = a_{\text{wopt}}$  ;  $a_{\text{wmin}}$ ,  $a_{\text{wopt}}$  et  $a_{\text{wmax}}$  ce sont les activités de l'eau cardinales.

### 1. V. 2. 2. Modèles d'inactivation

- le modèle utilisé pour décrire le taux de croissance en fonction du cuivre est dérivé du modèle d'inhibition non-compétitive décrit par Yano *et* Koga (1973) :

$$\mu = \frac{\mu_{\text{opt}}}{1 + \left(\frac{\text{Cu}}{\text{Cu}_{50}}\right)^p} \quad (7)$$

où  $\mu_{\text{opt}}$  (mm/j) représente le taux de croissance pour  $\text{Cu} = 0$ ,  $\text{Cu}_{50}$  est la concentration en cuivre pour laquelle  $\mu = \mu_{\text{opt}}/2$  et  $p$ , un paramètre de conception lié à la courbe.

- le modèle utilisé pour décrire l'influence du cuivre sur le temps de latence est une équation Monod re-paramétrée (Dantigny *et al.*, 2005a ; Dantigny *et al.*, 2005b) :

$$\lambda = \lambda_{\text{opt}} \frac{\text{Cu}_{200}(\text{MIC}) - 2\text{Cu}_{200}(\text{Cu}) + \text{Cu}(\text{MIC})}{\text{Cu}_{200}(\text{MIC} - \text{Cu})} \quad (8)$$

où  $\lambda_{\text{opt}}$  (h) est le temps de latence pour  $\text{Cu} = 0$ ,  $\text{Cu}_{200}$  est la concentration en cuivre pour laquelle  $\lambda = 2 \lambda_{\text{opt}}$  et MIC est la concentration minimale inhibitrice de cuivre pour un temps de latence infini.

### 1. V. 2. 3. Modèles polynomiaux

#### La matrice factorielle de Doehlert

Cette approche consiste à établir un plan d'expériences pour l'ensemble des facteurs considérés (température, activité de l'eau, etc.), dans un domaine expérimental bien défini. Les aptitudes de croissance sont évaluées pour chaque combinaison de conditions environnementales, par l'intermédiaire d'un paramètre tel que le taux de croissance. Un



modèle polynomial est alors ajusté par régression sur l'ensemble des données, ce qui permet d'estimer la valeur des coefficients du modèle (Buchanan *et* Phillips, 1990). L'approche polynomiale présente donc un intérêt fondamental lorsqu'il s'agit d'évaluer de façon objective le caractère significatif des effets de chaque facteur et de leurs interactions. Il est impératif de définir un domaine expérimental car toute extrapolation en dehors de la plage expérimentale est inadéquate. La matrice de Doehlert permet la description d'une région autour d'une réponse optimale et contient  $k^2+k+1$  points pour  $k$  facteurs.

### **Modèle de Fang**

En utilisant la méthodologie des plans d'expériences, Fang *et al.* (1994), ont étudié l'effet inhibiteur de la concentration en chitosan et de la teneur en sucre (°Brix), sur la croissance d'*Aspergillus sp.* dans des écorces de fruits. Un modèle polynomial du second ordre a été généré pour observer la croissance :

$$y = a + b[\text{chitosan}] + c(^{\circ}\text{Brix}) + d [\text{chitosan}]^2 + e [\text{chitosan}](^{\circ}\text{Brix}) + f(^{\circ}\text{Brix})^2 \quad (9)$$

La limite du modèle établi est liée à sa structure qui empêche toute extrapolation en dehors du domaine expérimental exploré.

### **Modèle de Gibson**

Gibson *et al.* (1994) ont modélisé l'effet de l'activité de l'eau sur la croissance d'*Aspergillus flavus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus* et *A. nomius*. Le modèle appliqué a été le suivant :

$$\ln g = C_0 + C_1 b_w + C_2 b_w^2 \quad \text{avec } b_w = \sqrt{1 - a_w} \quad (10)$$

où  $C_0$ ,  $C_1$  et  $C_2$  sont des constantes calculées par régression et  $g$  le taux de croissance maximum (la transformation logarithmique permet de stabiliser la variance). La transformation de  $a_w$  en  $b_w$  permet de représenter les données sous la forme d'une simple courbe.

La limite du modèle repose sur le nombre trop faible de facteurs pris en compte et le fait qu'il ne permet pas d'estimer l' $a_{w\min}$  de croissance. Enfin, contrairement aux modèles

cardinaux, les paramètres  $\mu_{opt}$  et  $a_{wopt}$  n'apparaissent pas dans l'équation mais sont calculés, une fois les constantes ( $C_0$ ,  $C_1$  et  $C_2$ ) estimées par régression.

### **1. V. 3. Validation des modèles prévisionnels**

Les statisticiens associent la notion de prédiction à l'estimation des valeurs théoriques comparées par la suite aux valeurs observées. Lors d'une approche agro-industrielle, à la démarche de simulation, s'ajoute une connaissance liée à l'écologie microbienne des produits et des procédés, nécessaire pour garantir une utilisation de l'outil adaptée à la réalité. Cette analyse est spécifique du produit, de la fabrication et du stockage.

## **PARTIE 2 MATERIELS ET METHODES**

## 2. I. MICROORGANISMES ET MILIEUX DE CULTURE

### 2. I. 1. Échantillonnage et dénombrement des moisissures

Des grappes de *Pinot Noir* ont été prélevées sur des parcelles de la commune de Morey-St Denis (Côte d'Or), à l'automne 2007. Chaque grappe à été pesée et ensuite lavée pendant une heure, dans un volume d'eau physiologique + Tween 80 (NaCl/eau distillée, 0,9 %, m/v ; 0,1 %, v/v), de même poids, pour mettre en suspension les micro-organismes présents à la périphérie des baies. A partir des dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-8}$ , de chaque suspension de lavage, des fractions de 0,1 mL ont été étalées au râteau sur milieu gélosé au Dichloran-rose Bengale (King *et al.*, 1979) et incubées à 25°C. Après 7 jours d'incubation, les moisissures ont été dénombrées et isolées en culture pure.

### 2. I. 2. Milieux de culture, inoculation et dispositif d'incubation

Les moisissures ont été entretenues sur gélose glucosée à l'extrait de pomme de terre (PDA, Potato Dextrose Agar, Biokar Diagnostics) à 25°C.

L'identification des moisissures a concerné le genre *Penicillium* car certaines espèces sont responsables de la production de géosmine (Larsen *et* Frisvad, 1995). Les critères morphologiques, macroscopiques et microscopiques, ont été observés sur milieu gélosé de Czapeck (CZ-broth, Difco ; solidifié par de l'agar 15 g/L). Le milieu CREA Agar, à base de créatine 0,3 % (m/v), a été préparé d'après les données de Samson *et* Frisvad (2004b), pour l'étude de la production d'acide par les souches de *Penicillium*, test complémentaire à l'identification morphologique. Pour l'extraction d'ADN, en vue de l'identification par biologie moléculaire, les souches de *Penicillium* ont été ensemencées sur milieu PDB (Potato Dextrose Broth, AES Laboratoires). Les cultures ont été incubées pendant 7 jours à 25°C.

Afin de déterminer les valeurs cardinales de température pour *B. cinerea* et *P. expansum*, on a utilisé le milieu PDA à une activité de l'eau ( $a_w$ ) de 0,99 et différentes températures d'incubation de 2, 5, 7, 8, 12, 15, 18, 20, 28 et 30°C. Pour les valeurs cardinales d' $a_w$ , la température d'incubation a été maintenue à 25°C, tandis que le milieu PDA a été ajusté à 0,99, 0,97, 0,95, 0,93, 0,91, 0,89, 0,87, 0,85  $a_w$ . Les  $a_w$  ont été déterminées avec AquaLab CX2T (Decagon, Devices, Pullman, WA, USA).

Les milieux au jus de raisin « naturel » (Benoît Portellia, Dellet, France) et « synthétique », pour l'étude de la validation du modèle prédictif de croissance, ont été préparés d'après Paterki *et al.* (2007) et Leong *et al.*, (2006). L'activité de l'eau des milieux a été déterminée à 0,985. Afin d'effectuer les expériences de validation, la température (7 à 25°C) ainsi que l'activité de l'eau (0,90 à 0,985) ont varié simultanément.

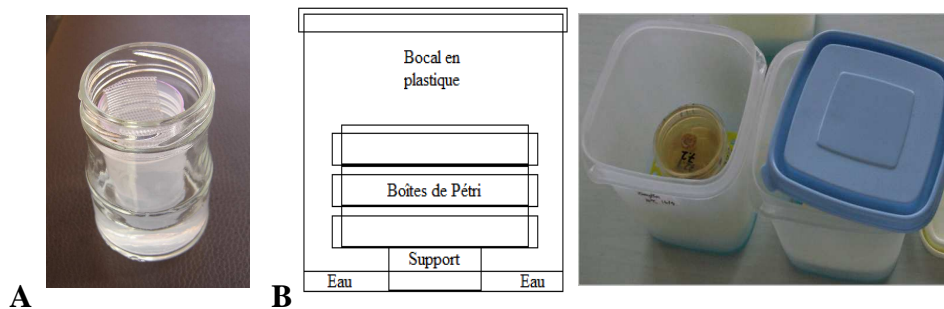
Dans le but de déterminer le taux de croissance optimal des moisissures sur baies de raisin, un dispositif expérimental a été développé (Figure 17). Les raisins (« Red Globe ») ont été nettoyés dans l'éthanol 35 % (v/v) pendant 1 minute et ensuite lavés avec de l'eau distillée et séchés. Les raisins ont été coupés en deux moitiés, une utilisée pour déterminer l' $a_w$  et le pH et la deuxième pour l'inoculation.

Le milieu PDA (0,99  $a_w$ ) a été supplémenté en cuivre ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , Sigma-Aldrich), sur une gamme de 9 concentrations, de 0 à 8 mM, pour étudier les effets du métal sur la croissance et le temps de latence des moisissures. Les cultures ont été incubées à 25°C.

Pour l'étude de la croissance et la production de géosmine on a utilisé le milieu CZA supplémenté en cuivre sur une gamme de 7 concentrations de 0 à 1,2 mM. Les cultures ont été incubées aux différentes conditions de température (10 à 30°C) et  $\text{CO}_2$  (0,03 à 3,00 %), pendant 7 jours, d'après le plan d'expériences établi par la matrice de Doehlert.

L'inoculation des milieux de culture solides est standardisée par le dépôt de 10  $\mu\text{L}$  de suspension de spores (ajustée à  $10^6$  sp/mL) déposés au centre de chaque boîte de milieu en fonction de l'étude effectuée. Une partie d'eau de la solution physiologique est remplacée par du glycérol (Fischer Scientific) pour l'ensemencement des milieux en différentes conditions d'activité de l'eau. Si la standardisation n'est pas nécessaire, une inoculation de solide à solide est effectuée en transférant un petit morceau de gélose portant du mycélium vers un milieu neuf au moyen de l'œse spatulée. Les boîtes de culture sont incubées dans le dispositif expérimental (Figure 17), afin de maintenir en équilibre l'humidité relative. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicat.

Les raisins ont été inoculés avec 10  $\mu\text{L}$  de la suspension de spores, proche du pédicelle, afin de suivre la croissance isotrope de la moisissure. Des photos du dispositif, sans ouvrir le couvercle, ont été effectuées tous les jours et analysées pour déterminer le rayon. Les raisins ont été incubés à 15°C.



**Figure 17.** Dispositif expérimental d'incubation, A-des boîtes de Petri, B-des raisins

### 2. I. 3. Dénombrement des spores

A 25°C sur milieu PDA, au bout de 7 jours, les spores sont récoltées. 20 g de billes verre ( $\varnothing = 0,2$  mm), ainsi que 10 mL d'eau physiologique stérile contenant 0,1% (v/v) de Tween 80 sont ajoutées à la boîte de Petri, laquelle est ensuite fermée avec du Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Chicago) et agitée 15 minutes à 110 rpm. Une goutte de la suspension de spores obtenue, est posée sur une cellule de Malassez pour le dénombrement des spores.

### 2. I. 4. Détection et dosage de la géosmine

L'analyse olfactive des cultures à l'issue de la période d'incubation, a permis de vérifier l'apparition de l'odeur moisie-terreuse (GMT). Une procédure de caractérisation en deux temps est alors appliquée :

- la première permet une analyse sensorielle, découlant d'un flairage direct des atmosphères sus-jacentes aux cultures, par un jury entraîné (expériences effectuées au laboratoire) ;
- la seconde permet d'obtenir des signatures instrumentales et des valeurs quantitatives (sous-traitance par le laboratoire Exact à Macon).

Les composés volatils des cultures en boîtes de Petri sont concentrés, après l'introduction du contenu total d'une boîte de milieu gélosé avec sa colonie mycélienne, dans un mélange alcool absolu /eau déminéralisée (20 %, v/v). La détection et le dosage sont effectués par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, selon le protocole de Dumoulin *et* Riboulet (2004). Dans ces conditions, les performances de la méthode d'extraction sont les suivantes : limite de détection - 5 ng/L ; répétitivité sur 2 fois 5

mesures - 6,7 % à 10 ng/L et 6,1 % à 100 ng/L ; linéarité entre 10 et 200 ng/L avec un facteur de corrélation  $R = 0,999$ .

### 2. I. 5. Modélisation et traitement des données

La croissance apicale des champignons est suivie sur boîte de Petri par mesure quotidienne de 2 diamètres perpendiculaires de la colonie mycélienne, à partir desquels on en déduira le rayon moyen. L'extension radiale en fonction du temps étant linéaire, un taux de croissance radial ( $\mu$ , mm/jour) est calculé par régression linéaire pour chaque facteur testé.

*L'effet de la température et de l'activité de l'eau sur la croissance* est déterminé par le modèle cardinal avec inflexion (CMI) (Rosso *et al.*, 1993 ; Sautour *et al.*, 2001). Une transformation racine carrée est effectuée pour stabiliser la variance de  $\mu$ .

La validation du modèle évaluant l'effet combiné de la température et de l'activité de l'eau, sur la croissance de *B. cinerea* et de *P. expansum* sur baies de raisins, est constituée de plusieurs étapes.

- à partir des valeurs de taux de croissance mesurés, on déduit le taux de croissance optimal calculé ( $\mu_{optc}$ ), correspondant à la variance si toutes les conditions optimales avaient été requises :

$$\mu_{optc} = \mu_{mesuré} / (\gamma(T) \times \gamma(a_w)) \quad (11)$$

- par la suite, on déduit un taux de croissance prédit ( $\mu_{prédit}$ ) à partir de la moyenne des  $\mu_{optc}$  :

$$\mu_{prédit} = \text{moyenne } \mu_{optc} \times \gamma(T) \times \gamma(a_w). \quad (12)$$

Ce  $\mu_{prédit}$  correspond au taux de croissance théorique que nous aurions dû avoir dans nos conditions expérimentales de température et d'activité de l'eau.  $\gamma(T)$  et  $\gamma(a_w)$  sont des facteurs liés aux valeurs cardinales de température et d'activité de l'eau de la souche considérée ; c'est le *gamma concept* de Wijtzes *et al.* (1998).

Grâce aux taux de croissance mesurés et taux de croissance prédits, on peut calculer le *bias factor* et l'*accuracy factor* (Ross, 1996), permettant de débiter la validation du modèle établi sur PDA.

Soit le rapport :  $\log(\mu_{prédit} / \mu_{mesuré})$ , pour n rapports, on a :

- le **bias factor** qui correspond à la moyenne des prévisions et des taux de croissance mesurés. Un *bias factor* égal à 1, représente un parfait accord entre les prévisions et les mesures :

$$Bf = 10^{\Sigma(\log(\mu \text{ prédit}/\mu \text{ mesuré})/n)} \quad (13)$$

- l'**accuracy factor** qui représente la précision de la manipulation et correspond à la dispersion des points par rapport à la droite :  $\mu \text{ prédit} = f(\mu \text{ mesuré})$ . Un *accuracy factor* de 1 correspond à un alignement parfait. Plus il sera proche de 1, plus la validation sera solide :

$$Af = 10^{\Sigma(|\log(\mu \text{ prédit}/\mu \text{ mesuré})|/n)} \quad (14)$$

**L'effet du cuivre sur la croissance des moisissures** à été traité par le modèle d'inhibition non-compétitive et par une équation Monod re-paramétrée (Yano *et* Koga, 1973 ; Dantigny *et al.*, 2005a). Une transformation racine carrée et logarithmique à été utilisée pour minimiser la variance de  $\mu$  et  $\lambda$ . Le temps de latence,  $\lambda$  (h), à été calculé à partir de l'intersection de la droite (extension radiale en fonction du temps) avec le rayon initial de la goutte d'inoculation (4,5 mm).

Le logiciel informatique SlideWrite 3.0 (Advanced Graphics Software, Inc, Carlsbad, CA, USA) a été utilisé pour traiter les données issues de ces études et déterminer les paramètres des modèles.

**Les effets combinés de la température, CO<sub>2</sub> et cuivre** ont été décrits par le modèle de Doehlert qui permet la description d'une région autour d'une réponse optimale et contient  $k^2+k+1$  points pour  $k$  facteurs. Le domaine expérimental est déterminé en fixant plusieurs niveaux pour chaque facteur, à partir d'une valeur centrale et d'un pas de variation. Le plan final d'expérimentation prend en compte tous les niveaux des  $k$  facteurs associés dans la réalisation des  $k^2+k+1$  expériences (Sautour *et al.*, 2001a). Pour trois facteurs (température, CO<sub>2</sub> et cuivre), 13 expériences sont nécessaires et dans ce cas une des propriétés de la matrice de Doehlert est l'uniformité de la distribution dans un espace tridimensionnel. 12 expériences sont donc équidistantes par rapport à un point central, l'expérience 1 (Figure 18).

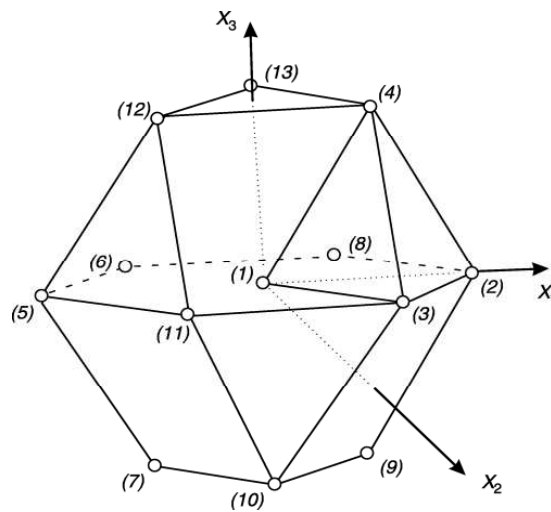
Pour calculer la réponse  $Y$ , une relation polynomiale du second ordre, comprenant les termes quadratiques est utilisée (Sautour *et al.*, 2003) :

(15)



$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3$$

où  $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$  représentent les facteurs.



**Figure 18.** Cuboctaèdre avec 13 points expérimentaux pour trois facteurs ( $X_1$ ,  $X_2$  et  $X_3$ ), d'après Sautour *et al.* (2001b)

Les données expérimentales relatives au plan d'expériences sont traitées par le logiciel Nemrod (LPRAI, Marseille). Chacun des coefficients ( $b_0$ ,  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$ ,  $b_{11}$ ,  $b_{22}$ , ...) du modèle polynomial est calculé par régression linéaire et l'analyse de leur significativité est basée sur un F-test. Concernant le réseau uniforme de Doehlert, une représentation graphique sous forme de surfaces d'isoréponses définit les conditions pour lesquelles la réponse est optimale.

## 2. II. IDENTIFICATION DES MOISSURES

L'identification a été effectuée selon des critères morphologiques et physiologiques (Pitt *et* Hocking, 1999 ; Samson *et al.*, 2004b).

Pour les souches de *P. expansum*, l'identification a été confirmée par analyse moléculaire des séquences de  $\beta$ -tubulines (Glass *et* Donaldson, 1995). Le gène de la  $\beta$ -tubuline est utilisé de plus en plus pour l'identification et la reconstruction phylogénétique de différents types d'organismes grâce à sa variabilité et à sa conservation dans la cellule eucaryote.

### 2. II. 1. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN des souches du genre *Penicillium* a été entreprise avec l'EZNA Fungal DNA Kit (Omega Bio-tek). Il faut pour cela collecter 100 mg de mycélium frais à partir d'une culture de 7 jours à 25 °C, sur milieu PDB (les échantillons peuvent être traités par série de 6). L'échantillon est déposé dans un tube Eppendorf qui contient de l'azote liquide et broyé grâce à un pilon. Afin de casser au mieux les parois des cellules fongiques, cette opération peut être répétée deux fois en rajoutant de l'azote liquide. 600  $\mu$ L de Tampon FG1 et 10  $\mu$ L de 2-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich) sont ajoutés au mycélium broyé et ensuite vortexés. Le tube est incubé à 65 °C pendant 10 minutes et mélangé à deux reprises pendant ce laps de temps. 140  $\mu$ L de Tampon FG2 sont rajoutés au tube Eppendorf, lequel est à nouveau vortexé. Une incubation de 5 minutes dans la glace doit être effectuée avant de centrifuger l'échantillon à 10 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant ainsi obtenu est mesuré et transféré dans un nouveau tube Eppendorf. Afin de précipiter l'ADN, 420  $\mu$ L d'isopropanol (Sigma-Aldrich) pour 600  $\mu$ L de surnageant sont ajoutés dans le tube et ensuite vortexés. Une nouvelle centrifugation de 2 minutes à 10 000 g permet la formation d'un culot d'ADN. Après l'élimination du surnageant, 300  $\mu$ L d'eau déminéralisée préchauffée à 65 °C sont nécessaires pour remettre en suspension l'ADN obtenu. Le tube est vortexé puis 8  $\mu$ L de RNase (20 mg/mL) sont ajoutés. 150  $\mu$ L de Tampon FG3 et 300  $\mu$ L d'éthanol 96 % (Elvetec Services) sont ajoutés dans le tube, lequel est ensuite vortexé. L'échantillon complet est transféré dans une colonne HiBind™ placée dans un tube de prélèvement de 2 mL. Après une centrifugation à 10 000 g pendant 1 minute (pour lier l'ADN à la colonne), celle-ci est transférée dans un nouveau tube de prélèvement. 750  $\mu$ L de Tampon de lavage dilué avec de

l'éthanol absolu sont ajoutés dans la colonne et centrifugés pendant 1 minute à 10 000 g. Cette étape est réalisée une seconde fois. La colonne est centrifugée pendant 2 minutes à une vitesse maximale pour éliminer les traces d'éthanol. Elle est ensuite transférée dans un nouveau tube Eppendorf. 100 µL de Tampon d'éluion (ou de l'eau déminéralisée) préchauffée à 65 °C sont additionnés à la colonne, laquelle est incubée 5 minutes à 60 °C. Une centrifugation d'une minute à 10 000 g va permettre de récolter l'ADN dans le tube Eppendorf. L'ADN est ensuite conservé au congélateur.

## **2. II. 2. Dosage de l'ADN**

Le dosage et le contrôle de la qualité d'ADN est réalisé après chaque extraction par spectrophotométrie, à l'aide d'un spectrophotomètre (Eppendorf, Le Pecq, France). Les rapports de densité optique sont déterminés afin d'évaluer la qualité des échantillons. Les bases puriques et pyrimidiques absorbant fortement dans l'ultraviolet à 260 nm. Une unité de densité optique (DO) à 260 nm correspond à une solution d'ADN double brin de 50 µg/mL. Aussi il convient de rechercher une éventuelle contamination protéique. Pour cette raison on effectue une seconde mesure de DO à 280 nm. Un ADN pur doit avoir un rapport DO 260/280 compris entre 1,8 et 2. Une éventuelle contamination par du phénol, peut être recherchée en mesurant l'absorption à 270 nm.

## **2. II. 3. Amplification par PCR**

L'amplification du gène de la β-tubuline a été effectuée avec les amorces Bt2a et Bt2b (Glass *et* Donaldson, 1995) : Bt2a : 5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC 3'

Bt2b : 5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC 3'

L'amplification a été réalisée grâce au mélange suivant : 2 µL ADN (10 ng/µL), 0,5 µL Taq Polymérase (2,5 U/µL, Euromedex), 5 µL dNTP (1 mM, Invitrogen), 0,5 µL de chaque amorce (50 pmol/µL, Eurogentec), 2,5 µL Tamponx10 (Euromedex), 1,25 µL MgCl<sub>2</sub> (Euromedex), 0,75 µL DMSO (Euromedex) et de l'eau ultra pure jusqu'à 25 µL.

La PCR a été réalisée dans un thermocycleur iCycler™ Thermal Cycle (BioRad). Pour réduire les amplifications non-spécifiques, la « Touchdown » PCR a été appliquée aux échantillons (Samson *et al.*, 2004a). Cette PCR utilise, pour les premiers cycles, une température d'hybridation supérieure à la température optimale des amorces, qui ensuite diminue de 1 °C par cycle, jusqu'à elle atteigne la température spécifique (« touchdown »)

d'hybridation des amorces. La dénaturation à 94 °C pendant 1 minute a été suivie par 5 cycles comprenant une dénaturation à 94 °C pendant 1 minute, une hybridation à 68 °C pendant 90 secondes et une élongation à 72 °C pendant 2 minutes ; avec une diminution de la température d'hybridation de 1 °C par cycle. Ensuite, les 5 cycles ont été suivis par 25 cycles comprenant une dénaturation à 94 °C pendant 1 minute, une hybridation à 64 °C pendant 90 secondes et une élongation à 72 °C pendant 2 minutes. Une élongation à 72 °C pendant 10 minutes a finalisé cette PCR.

#### **2. II. 4. Electrophorèse**

Les produits PCR sont contrôlés par électrophorèse. La migration des fragments a été réalisée dans un gel d'agarose 1,5 % (Euromedex), préparé dans du Tampon TAE<sub>x</sub>1 (Tris Acétate, Euromedex) à 90 V pendant 60 minutes. 5 µL d'échantillon mélangé à du Bleu de Bromphénol (6xLoading Dye Solution, Euromedex) ont été déposés dans les puits. Pour pouvoir repérer le gène de la β-tubuline (environ 500 pb), un marqueur moléculaire (Mass Ruler™ Express DNA Ladder Mix Forxard, 56 ng/µL, Fermentas) a été utilisé.

#### **2. II. 5. Séquençage et analyse des séquences**

Les produits PCR ont été séquencés dans les deux directions, avec les amorces Bt2a et Bt2b. Le séquençage a été réalisé par la société Beckman Coulter Genomics (Takeley, UK). Les produits PCR ont été préalablement purifiés (peqGold Gel Extraction Kit, peqLab, Biotechnologie GmbH) et ensuite préparés d'après les recommandations d'envoi au séquençage ([www.beckmangenomics.com](http://www.beckmangenomics.com)). Une recherche d'homologie est effectuée afin de pouvoir identifier les *Penicillium*. Les bases de données moléculaires sont riches en séquences du gène de la β-tubuline. Un Blast nucléotidique (Basic Local Alignment Tool), entre les séquences de nos échantillons et celles de la base de données, est réalisé sur le site du NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). L'algorithme renvoie certains paramètres qui permettent de déterminer s'il y a une cohérence biologique entre les alignements. Plus la E-value (probabilité que la séquence similaire retrouvée l'ait été par hasard) est faible, plus l'alignement est significatif. Le logiciel R (2.7, Development Core Team) et PhyML (accessible en ligne, [www.phylogeny.fr](http://www.phylogeny.fr)), ont été utilisés pour la construction de la dendrogramme et de l'arbre phylogénétique.

## **PARTIE 3 RESULTATS ET DISCUSSION**

## **3. I. IDENTIFICATION DE LA MICROFLORE DES BAIES DE RAISINS**

### **3. I. 1. Introduction**

La pellicule du raisin présente une microflore variée composée des bactéries, levures et moisissures, appelée flore indigène ou microflore épiphyte. De nombreux facteurs, géographiques ou climatiques, peuvent faire varier cette flore. Si une partie de la microflore est nécessaire à la bonne réalisation des étapes fermentaires, l'autre partie est responsable des déviations organoleptiques (odeur de terre, odeur de champignon frais) nuisibles à la qualité du vin.

Des études préliminaires ont mis en évidence l'origine fongique des déviations organoleptiques (Darriet *et al.*, 2000). *Botrytis cinerea* responsable de la « pourriture grise » produit du 2-méthyle-isoborneol, tandis que, plusieurs espèces du genre *Penicillium* ont été décrites comme productrices de la géosmine. La caractérisation de ce dernier présente donc un grand intérêt pour cette étude.

Ces constatations ont motivé notre étude sur l'identification de la microflore fongique des baies de raisins de Bourgogne, dans le but d'isoler des espèces productrices de déviations organoleptiques de type moisi-terreux dans le vin, en Bourgogne. Des grappes de *Pinot Noir* ont été prélevées sur des parcelles de la commune de Morey-St Denis (Côte d'Or) à l'automne 2007 afin de pouvoir isoler un maximum de moisissures.

Tout d'abord on a distingué les différents genres par les critères morphologiques. Notre étude c'est ensuite centrée sur l'identification moléculaire de souches du genre *Penicillium*, par l'amplification du gène de la  $\beta$ -tubuline.

### **3. I. 2. Analyse de la microflore fongique des vignobles de Morey**

#### ***Aspects quantitatifs de la contamination***

Les prélèvements des échantillons de raisins ont été effectués sur 5 parcelles de vignobles de Morey (Côte d'Or) associées principalement au défaut GMT. Les grappes (45 à 260 g) de raisins visiblement contaminées par *Botrytis sp.*, ou d'autres moisissures, ont été rincées par une masse équivalente d'eau physiologique additionnée de Tween 80 à 0,1 % (v/v). Les dénombrements effectués sur la première eau de lavage des différentes grappes

permettent d'apprécier la charge fongique en Unités Formant Colonies par gramme de raisin (UFC.g<sup>-1</sup>) (Tableau 8).

**Tableau 8.** Charge fongique des raisins contaminés des vignobles de Morey

Lieux de prélèvements	Valeurs extrêmes des masses des grappes (g)	Charge fongique initiale moyenne (milieu PDA) UFC.g <sup>-1</sup>
Morey 1	75 - 245	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>4</sup>
Morey 2	105 - 260	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>4</sup>
Morey 3	64 - 110	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>
Morey 4	45 - 121	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>
Morey 5	75 - 150	10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>

Dans l'ensemble, le taux de contamination des raisins apparaît assez homogène et ne dépasse pas les 10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup>.

### *Aspects qualitatifs de la contamination*

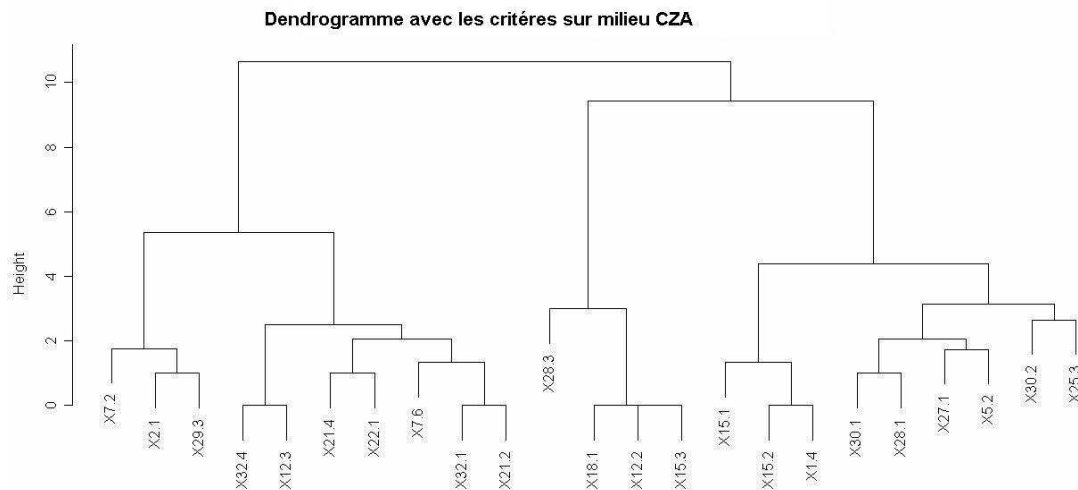
A partir des raisins contaminés prélevés en Bourgogne, on a pu isoler une centaine de moisissures. Les caractères morphologiques décrits par Pitt *et* Hocking (1999) ont révélé la présence prédominante de quelques genres de moisissures. Par ordre de fréquence décroissante on remarque : *Botrytis* (53 %), *Penicillium* (23 %), *Cladosporium* (5 %), *Aspergillus* (3 %) et d'autres genres (17 %). Ces résultats confirment les identifications de la flore d'altération de la vigne rapportées par les travaux de Fleet (2003) et Loureiro *et* Malfeito-Ferreira (2003).

### **3. I. 3. Regroupements taxonomiques des espèces de *Penicillium***

#### **3. I. 3. 1. Analyse hiérarchique ascendante des critères morphologiques**

Après croissance sur milieu gélosé de Czapek (CZA), un crible de caractères morphologiques, microscopiques et macroscopiques, adaptés des travaux de Pitt *et* Hocking (1999) et Samson *et al.* (2004b), a conduit à un premier regroupement d'une vingtaine d'isolats du genre *Penicillium*. Parmi ces caractères on peut énumérer : la taille, la couleur face et revers de la colonie ; la taille et la forme des conidies ; la taille et la forme des phialides ; le branchement du conidiophore. Les caractères observés ont été comparés avec les descriptions morphologiques des moisissures, accessibles sur le site du CBS-Fungal Biodiversity Center ([www.cbs.knaw.nl](http://www.cbs.knaw.nl)).

Les réponses brutes découlant du crible des caractères morphologiques ont été soumises à une analyse hiérarchique ascendante au moyen d'un logiciel de statistique (R version 2.7, Development Core Team). Sur la base des critères morphologiques choisis, le résultat des regroupements des isolats du genre *Penicillium*, est constitué d'un dendrogramme qui fait apparaître huit pôles taxonomiques (Figure 19).



**Figure 19.** Relations taxonomiques entre les souches de *Penicillium* isolées en Bourgogne, basées sur des critères morphologiques

### 3. I. 3. 2. Intérêt taxonomique du milieu CREA

La confrontation supplémentaire avec le test d'acidification sur milieu CREA a permis d'ajouter un critère métabolique, au crible d'analyse des isolats de *Penicillium*. L'homogénéité des 8 pôles a été précisée et la vingtaine de souches se regroupent alors en 13 groupes, dont deux sont rapidement identifiés au niveau de l'espèce :

Groupe 1 → 4 souches : 12.2, 28.1, 15.3 et 18.1 : *Penicillium citrinum*

Groupe 9 → 1 souche : 25.3 : *Penicillium expansum*



Ainsi, à cette étape de l'étude, une seule souche de *P. expansum*, espèce rarement isolée de vignobles de Côte d'Or, a pu être identifiée.

### **3. I. 3. 3. Identification moléculaire des souches du genre *Penicillium* isolées**

#### **3. I. 3. 3. 1. Analyse des séquences par comparaison à une base de données**

L'identification sur la base des critères morphologiques a été ensuite vérifiée par l'analyse moléculaire. Pour cette identification on a pris comme témoin *P. roqueforti* (souche n°818, collection du laboratoire). Les amorces Bt2a et Bt2b (Glass *et* Donaldson, 1995) ont amplifié un fragment d'environ 500 pb du gène de la  $\beta$  tubuline des souches de *Penicillium sp.* isolées. Afin de vérifier la cohérence du séquençage, un alignement a été réalisé pour toutes les souches entre les séquences forward (Bt2a) et la reverse complémentaire de la séquence reverse (Bt2b). Les pourcentages d'alignements obtenus, compris entre 90 et 99 % nous ont permis d'affirmer que le séquençage a bien fonctionné.

Un BLAST des séquences de  $\beta$  tubulines des souches de *Penicillium sp.* isolées a été effectué avec la base de données du NCBI, riche en séquences de  $\beta$  tubulines des champignons. Les résultats sont présentés dans le Tableau 9.

Pour cette analyse on tient compte de la E-value qui indique le nombre d'alignements différents, que l'on peut espérer trouver par hasard dans la banque (même s'il n'existe pas de séquence similaire), et ayant le même degré de similitude. La E-value dépend de la taille de la séquence, de la taille de la banque et du score d'alignement (S). Un alignement est d'autant plus significatif que S est élevé et E-value faible. En revanche, une E-value plus élevée indique que la souche inconnue est proche d'une espèce de référence et présente avec elle des différences au niveau de la séquence de la  $\beta$  tubuline. On note une E-value égale à 0 pour la majorité des souches ce qui indique que l'alignement obtenu est valide (Tableau 9). Des scores élevés (98 et 99 %) et une E-value égale à 0 permettent d'identifier une dizaine d'isolats fongiques de Bourgogne à des espèces de *Penicillium* de la base de données.

Pour la souche 29.3 on obtient une E-value égale à 0 avec trois espèces du genre *Penicillium*, mais *P. bialowiezense* est un synonyme du *P. brevicompactum* qui est très proche de *P. biourgeianum* (Peterson, 2004). Un résultat significatif d'un BLAST indique une similitude entre les séquences et une présomption d'homologie. Une absence de similarité ne signifie pas une absence d'homologie entre deux séquences.

**Tableau 9.** BLAST des gènes de la  $\beta$  tubuline

Souches isolées /Amorce	% Identité	Score	E - value	Blast NCBI (souches dans la base de données)
<i>P. roquefortii</i> / BT2B	98%	798	0,00	<i>Penicillium roquefortii</i> strain CBS 23438 beta tubulin like gene, partial sequence
25.3 / BT2B	98%	789	0,00	<i>Penicillium expansum</i> strain CBS 32548 beta tubulin gene, partial cds
1.4 / BT2B	99%	761	0,00	<i>Penicillium chrysogenum</i> strain CBS 478.84 beta tubulin gene, partial cds
2.1 / BT2B	98%	802	0,00	<i>Penicillium citrinum</i> strain 217P beta tubulin gene, partial sequence
	93%	649	0,00	<i>Eupenicillium tropicum</i> beta tubulin gene, partial cds
5.2 / BT2B	92%	638	1e – 179	<i>Penicillium glabrum</i> strain 207P beta tubulin gene, partial sequence
	93%	617	1e – 173	<i>Penicillium thomii</i> strain CBS n 350.59 beta tubulin like gene, partial sequence
7.6 / BT2B	98%	782	0,00	<i>Penicillium brevicompactum</i> strain CBS 110069 beta tubulin gene, partial cds
12.2 / BT2B	95%	564	2e – 157	<i>Penicillium pinophilum</i> strain L14 beta tubulin gene, partial sequence
	84%	405	1e – 109	<i>Talaromyces trachyspermus</i> isolate W26 beta tubulin like gene,
	82%	348	2e – 92	<i>Talaromyces ucrainicus</i> isolate S27 beta tubulin like gene, partial sequence
12.3 / BT2B	98%	765	0,00	<i>Penicillium brevicompactum</i> strain 282P beta tubulin gene, partial sequence
15.2 / BT2B	97%	778	0,00	<i>Penicillium atramentosum</i> strain CBS 29148 beta tubulin gene, partial cds
15.3 / BT2B	95%	564	2e – 157	<i>Penicillium pinophilum</i> strain L14 beta tubulin gene, partial sequence
21.1 / BT2B	98%	782	0,00	<i>Penicillium brevicompactum</i> strain CBS 110069 beta tubulin gene, partial cds
21.2 / BT2B	98%	776	0,00	<i>Penicillium brevicompactum</i> strain CBS 110069 beta tubulin gene, partial cds
21.4 / BT2B	98%	784	0,00	<i>Penicillium brevicompactum</i> strain CBS 110069 beta tubulin gene, partial cds
22.1 / BT2B	98%	811	0,00	<i>Penicillium brevicompactum</i> strain CBS 110069 beta tubulin gene, partial cds
28.1 / BT2B	94%	595	6e – 167	<i>Penicillium thomii</i> strain CBS n 350.59 beta tubulin like gene, partial sequence
	91%	582	4e – 163	<i>Penicillium glabrum</i> strain 207P beta tubulin gene, partial sequence
29.3 / BT2B	98 %	780	0,00	<i>Penicillium bialowiezense</i> strain CBS 112882 beta tubulin gene, partial cds
	99%	750	0,00	<i>Penicillium biourgeianum</i> strain NRRL 2013 beta tubulin gene, partial cds
	99%	750	0,00	<i>Penicillium brevicompactum</i> strain DAOM 215332 beta tubulin gene, partial sequence
30.1 / BT2B	97%	739	0,00	<i>Penicillium corylophilum</i> strain 345P beta tubulin gene, partial sequence
	86%	475	8e – 131	<i>Penicillium citreonigrum</i> strain 272P beta tubulin gene, partial sequence
32.4 / BT2B	99 %	793	0,00	<i>Penicillium brevicompactum</i> strain 282P beta tubulin gene, partial sequence

### 3. I. 3. 3. 2. Construction de l'arbre phylogénétique

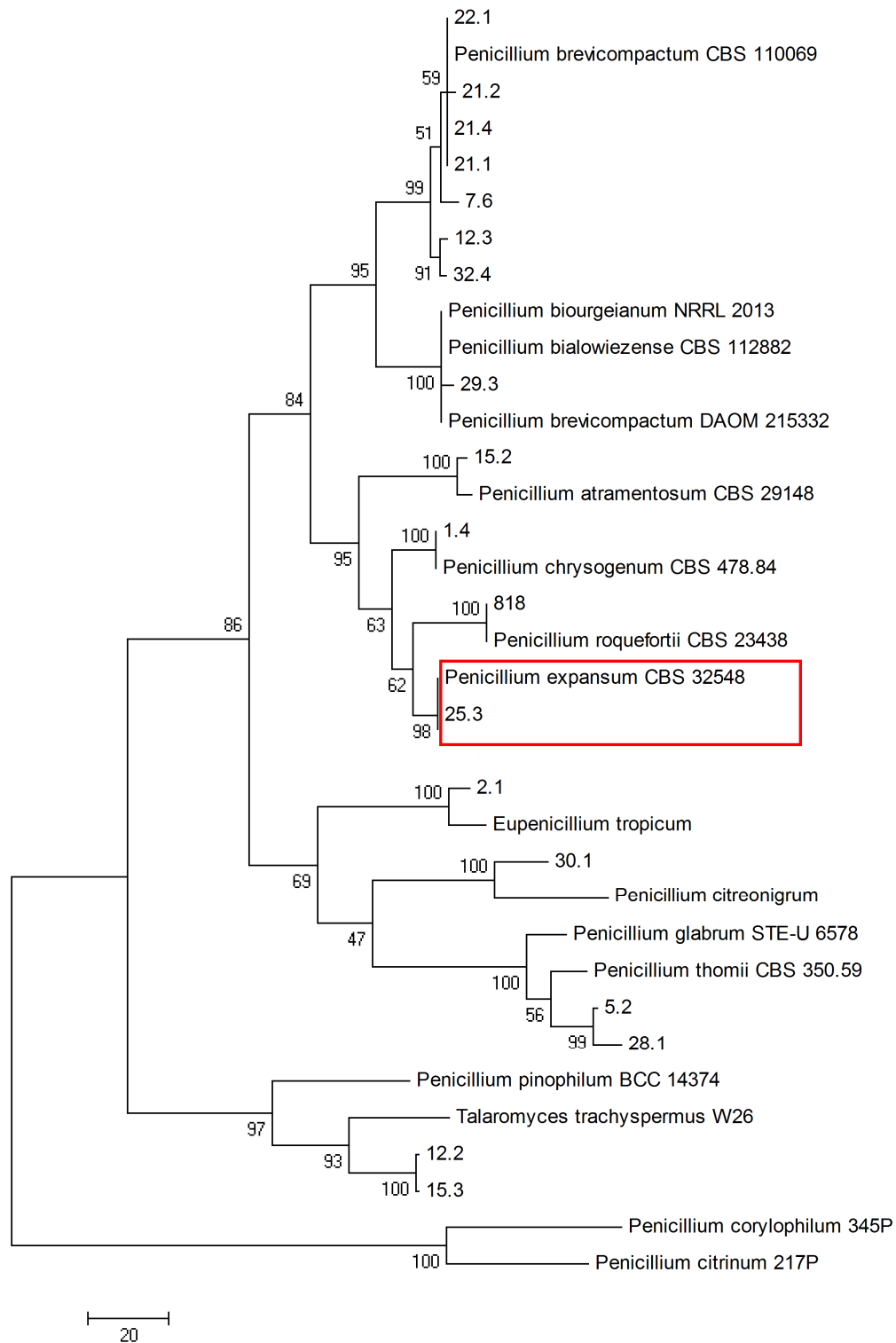
La construction d'un arbre phylogénétique prend en compte les changements survenus au cours de l'évolution. Il établit des liens de parenté entre les espèces, à partir de l'analyse de séquences, par l'intermédiaire d'un alignement multiple contrairement au BLAST qui est basé sur un alignement local.

A partir des séquences de  $\beta$  tubulines de *Penicillium* obtenues dans cette étude et des séquences de la base de données avec lesquelles on a obtenu le meilleur BLAST (Tableau 9), on a construit un arbre phylogénétique à l'aide du logiciel en ligne PhyML ([www.phylogeny.fr](http://www.phylogeny.fr)). Pour cela on a choisi la méthode du maximum de vraisemblance, basée sur la recherche de l'arbre optimal en attribuant une probabilité à chaque changement dans les séquences. La fiabilité et la robustesse de la topologie obtenue a été évaluée par la méthode du Bootstrap pour laquelle on a choisi une valeur de 100 (construction de 100 arbres et choix du plus fiable).

*P. glabrum* et *P. thomii* sont deux espèces très proches du point de vue morphologique et moléculaire (Samson *et al.*, 2004a). Les souches 5.2 et 28.1 s'identifient à *P. thomii* d'après l'arbre phylogénétique (Figure 20).

Les espèces du genre *Penicillium* peuvent avoir des téléomorphes dans *Eupenicillium* et *Talaromyces* (Pitt et Hocking, 1999). Les souches 12.2 et 15.3 s'identifient à *Talaromyces trachyspermus* avec une valeur de bootstrap de 93. La souche 30.1 montre clairement l'appartenance à *P. citreonigrum* et non pas à *P. corylophilum* comme on a pu voir dans le Tableau 9. Les souches 7.6, 12.3, 21.1, 21.2, 21.4, 22.1 et 32.4 appartiennent à *P. brevicompactum*. La variation, dans la base de données, des alignements de séquence de  $\beta$  tubuline de cette souche, explique les valeurs de Bootstrap comprises entre 51 et 91 ; mais en revanche le clade est bien fiable par une valeur de Bootstrap de 99.

L'analyse phylogénétique a permis la description des souches de *Penicillium* isolées en Bourgogne. Cette méthode est fiable et rapide mais elle présente des limitations pour les souches très proches. L'amplification d'une séquence du gène de la  $\beta$  tubuline n'est pas suffisante pour différencier des souches telles que *P. thomii*, *P. glabrum*, *P. biourgeianum* ou *P. bialowiezense*. L'analyse du Blast et l'arbre phylogénétique ont confirmé l'identification de la souche 25.3 appartenant à l'espèce *P. expansum*.



**Figure 20.** Arbre phylogénétique des souches de *Penicillium* isolées en Bourgogne (en chiffres) et des espèces de la base de données (en lettres)

### 3. I. 4. Recherche des souches de *Penicillium* productrices de géosmine

La dizaine de souches isolées de Côte d'Or et identifiées au niveau moléculaire ont été testées pour la production de géosmine sur milieu Czapek-Agar (CZA). A partir des suspensions de spores ( $10^6$  sp/mL) les boîtes de Petri ont été inoculées et incubées à 25°C, pendant 7 jours. Un jury constitué de trois personnes a permis d'identifier les cultures présentant le plus d'odeur moisi-terreux.

Le flairage des cultures ainsi que la caractérisation instrumentale des extraits de mycélium par Microextraction en phase solide (CPG-SPME, Dumoulin *et* Riboulet, 2004) ont donné des résultats négatifs, à l'exception de la souche 25.3 seule souche productrice de géosmine et par ailleurs identifiée à *Penicillium expansum*. Cette souche a été retenue pour nos prochains travaux expérimentaux.

### 3. 1. 5. Conclusions

Les observations morphologiques ont permis l'identification d'une centaine de moisissures. Le quart d'entre elles, non assimilées aux genres *Botrytis* ou *Penicillium* n'ont pas présenté d'intérêt pour cette étude.

L'amplification du gène de la  $\beta$ -tubuline (gène très conservé avec une grande variabilité) a permis une différenciation rapide et efficace des espèces du genre *Penicillium*. En revanche cette méthode présente des limitations au niveau des souches taxonomiquement très proches.

La part de la présente étude, portant sur les effets des facteurs environnementaux sur la croissance et la production de géosmine, concernera deux souches de l'espèce *Botrytis cinerea*, BC1 et BC2, identifiées par la méthode morphologique et la souche de *Penicillium expansum* 25.3, identifiée par biologie moléculaire.

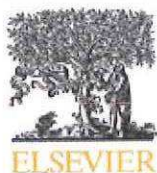
## **3. II. VALIDATION DES EFFETS COMBINES DE LA TEMPERATURE ET DE L'ACTIVITE DE L'EAU SUR LA CROISSANCE DE *BOTRYTIS CINEREA* ET DE *PENICILLIUM EXPANSUM* SUR BAIES DE RAISINS**

### **3. II. 1. Présentation**

Le réchauffement climatique est lourd de conséquences pour la vigne et le raisin. Chaque cépage est adapté aux conditions climatiques de sa région et un changement de température engendre des anomalies de production, parfois importantes. C'est ainsi que certaines moisissures se développant dans des régions méditerranéennes, sont retrouvées anormalement dans des régions plus septentrionales.

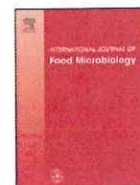
Selon les protocoles de la mycologie prévisionnelle, on a modélisé la croissance apicale sur milieu modèle (PDA) de *B. cinerea* et *P. expansum*, en fonction de la température et de l'activité de l'eau, pour en déduire le taux de croissance optimal ( $\mu_{opt}$ ) ainsi que les valeurs cardinales ( $T_{min}$ ,  $T_{opt}$ ,  $T_{max}$ ,  $a_{wmin}$ ,  $a_{wopt}$ ,  $a_{wmax}$ ). L'objectif a été de valider (grâce au *gamma concept*,  $\mu = \mu_{opt} \gamma(T) \gamma(a_w)$ ) sur jus de raisin naturel et sur jus synthétique, les résultats obtenus sur milieu modèle et d'en déduire le  $\mu_{opt}$  de chaque souche sur baie de raisin.

Sur milieu PDA, les facteurs température (de 2 à 30°C) et  $a_w$  (de 0,85 à 0,99) testés, ont varié indépendamment. Sur jus de raisin (naturel et synthétique), la température (de 7 à 25°C) et l' $a_w$  (de 0,90 à 0,99) ont varié simultanément. Les raisins ont été incubés dans des dispositifs adaptés afin de pouvoir mesurer le rayon (croissance isotropique) et d'en déduire le taux de croissance,  $\mu$ . L'effet combiné de la température et de l'activité de l'eau sur le  $\mu$  obtenu, a été calculé, afin d'obtenir le taux de croissance optimal des moisissures, sur baies de raisins, si les conditions avaient été optimales.



Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Food Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)

## Validation of a predictive model for the growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on grape berries

Daniela Judet-Correia<sup>a</sup>, Sophie Bollaert<sup>b</sup>, Alison Duquenne<sup>b</sup>, Claudine Charpentier<sup>c</sup>,  
Maurice Bensoussan<sup>b</sup>, Philippe Dantigny<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire Eau, Molécules Actives, Macromolécules, Activité, Université de Bourgogne, Dijon, France

<sup>b</sup> GTR Mycologie, Sécurité Microbiologique Alimentaire et Environnement, Université de Bourgogne, Dijon, France

<sup>c</sup> Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, UMR INRA 1131, Université de Bourgogne, Dijon, France

<sup>d</sup> Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires, Université de Bourgogne, Dijon, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 March 2010

Received in revised form 17 May 2010

Accepted 15 June 2010

#### Keywords:

Model

Validation

Growth

*Botrytis cinerea*

*Penicillium expansum*

Mould

### ABSTRACT

The objective of this study was to develop and to validate a model for predicting the combined effect of temperature and  $a_w$  on the radial growth rate,  $\mu$ , of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on grape berries. The proposed strategy was based on the gamma-concept developed previously [Zwietering, M.H., Wijnztes, T., de Wit, J.C., van't Riet, K. 1992. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *Journal of Food Protection*. 12, 973–979]:  $\mu = \mu_{opt} \cdot \gamma(T) \cdot \gamma(a_w)$ , where the gamma functions were cardinal models with inflection (CMI),  $\mu_{opt}$  the radial growth rate on grape berries. Firstly, the cardinal temperatures and  $a_w$ 's were estimated independently from experiments carried out on Potato Dextrose Agar. Secondly, the gamma concept was validated i/ on a synthetic grape juice medium (SGJ) and ii/ on a grape juice agar (GJA). Accuracy and bias factors were closer to 1 with the latter analogue, thus suggesting that GJA should be preferred to SGJ. Thirdly, an experimental protocol taken into account the isotropic nature of fungal growth was developed for estimating  $\mu_{opt}$  on grape berries. This study demonstrated that CMI's can be validated on agri-food products over a wide range of temperature and  $a_w$  using the described methodology.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

One of the most important aspects of model development is ensuring that predictions made by the model are applicable to real situations. Therefore the validation process is essential. It should involve comparisons of the predictions of the model with observed measurements, which should be different data to those used to construct the original model (Brocklehurst, 2004). Very few models in scientific literature have externally validated the models developed to describe fungal growth (Garcia et al., 2009). Battey et al. (2001) constructed a probability model for *A. niger* and *P. spinulosum* on a beverage analogue and validated it in an external set of beverage analogues. Probability growth and OTA production models developed for *A. carbonarius* were validated on pistachio nuts (Marín et al., 2008) and on simulated grape juice medium (Tassou et al., 2009).

Kinetic models were also validated on analogues and food products. A predictive model for the effect of water activity and

temperature on the growth of two ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* was validated on synthetic grape juice medium (Tassou et al., 2007). In that study, external data taken from Mitchell et al. (2004) and Bellí et al. (2005) were used to validate the model over a wide range of temperature and water activity. A predictive model was validated on apple, but only for the effect of temperature on the growth of *Penicillium expansum* (Baert et al., 2007a). In fact, the effect of the water activity cannot be assessed on apples because hydration or drying of apples is difficult. In contrast, corn can be more easily hydrated by the direct addition of sterile distilled water. Accordingly a predictive model for the combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* was validated on corn (Samapundo et al., 2005). In this study,  $a_w$  was in the range 0.869–0.982. Due to difficulties in hydrating the maize grains to  $a_w$ 's greater than 0.985 the cardinal  $a_w$ 's optimum and maximum could not be determined. Accordingly, it was concluded that models based on cardinal  $a_w$ 's could not be developed and consequently not validated on corn (Samapundo et al., 2005).

The objective of the present study was to develop an alternative strategy to validate models on products characterised by a water activity that cannot be changed easily. The strategy was based on the gamma-concept:  $\mu = \mu_{opt} \cdot \gamma(T) \cdot \gamma(a_w)$  where each gamma function

\* Corresponding author. Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires, Ensibana, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France. Tel.: +33 3 80 77 40 71.

E-mail address: [phdant@u-bourgogne.fr](mailto:phdant@u-bourgogne.fr) (P. Dantigny).



$\gamma(x)$  was defined for each of the variables separately, independent of the value of the other one (Zwietering et al., 1992). The gamma functions were based on cardinal values that were estimated independently on semi-synthetic medium. The combined effects of water activity and temperature were validated on analogues over a wide range of conditions allowing the growth of the fungi. Eventually, assuming that the cardinal values were independent from the medium, the optimum radial growth rate,  $\mu_{opt}$ , was estimated on the food product using the validated model.

The alternative protocol was applied for berries of the “Red Globe” cultivars. Fungi which commonly infect berries include the mildew pathogens *Erysiphe necator* (*Uncinula necator*) and *Plasmopara viticola*, as well as *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Botrytis cinerea*, *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp. and *Rhizopus* spp. (Hewitt, 1988; Emmett et al., 1992). Among these fungi, postharvest gray mould, caused by *B. cinerea*, is a major cause of decay of table grape berries (Nelson, 1985; Barkai-Golan, 2001; Lichter et al., 2002). Accordingly, *B. cinerea* was selected in the present study, in addition to *P. expansum* that may produce patulin (Abrunhosa et al., 2001) and geosmin (Mattheis and Roberts, 1992).

## 2. Material and methods

### 2.1. Fungal isolates

Microorganisms were isolated from spoiled wine grapes (*Vitis vinifera*) of cv. Pinot Noir, collected in Morey-St Denis (Burgundy, France) vineyards in September 2007. Each grape sample was washed with the same weight of saline solution (NaCl 9 g/l), containing Tween 80 (0.1% v/v) to remove microorganisms from the berries. The suspensions were stirred for one hour at ambient temperature (approximately 20 °C). Fractions of 0.1 ml of the diluted suspensions (from  $10^{-1}$  to  $10^{-8}$ ) were spread on Petri dishes that contained Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar medium (Difco, Pessac, France) and incubated at 25 °C. After 7 days incubation, colonies were isolated in pure culture. Amongst the isolated strains, *Botrytis cinerea* (strain Bc1) and *Penicillium expansum* (strain 25.03) were identified at the laboratory according to macroscopic criteria (Samson et al., 2004) and maintained on Potato Dextrose Agar (PDA; bioMérieux, Marcy l’Etoile, France) at room temperature, from 17 to 25 °C.

### 2.2. Spore preparation

Fungi were inoculated on PDA medium and incubated at 25 °C for 7 days. Sterile saline (NaCl, 9 g/l) solutions that contained Tween 80 (0.1% vol/vol) were adjusted to the water activity of the subsequent experiments by substituting a part of water with glycerol (Gervais et al., 1988). Sporulating cultures were flooded with 4.5 ml of the saline solution. Suspension counts were determined by a Malassez cell and standardised to  $10^6$  spores per ml. 10  $\mu$ l of the spore suspensions were used to inoculate the centre of the dishes.

### 2.3. Media

#### 2.3.1. Medium for determination of the cardinal values

The PDA medium 0.99  $a_w$  was used for assessing the effect of temperature on the radial growth rate. Incubation temperatures were 2, 5, 7, 8, 12, 15, 18, 20, 28 and 30 °C (accuracy  $\pm 1$  °C) depending on the species. The PDA medium was used at 25 °C for assessing the effect of  $a_w$  on the radial growth rate. The  $a_w$  of the unmodified PDA medium was 0.99. A part of water was substituted for glycerol to obtain water activities in decrements of 0.02 to a minimum of 0.85. Water activities were determined using an Aqualab CX2T (Decagon Devices, Pullman, WA, USA) with an accuracy of  $\pm 0.003$ . Dishes were placed in 1.5–l closed boxes in which relative humidity was controlled by ca. 150 ml of a glycerol–water solution (Sautour et al., 2001).

#### 2.3.2. Media for validation of the cardinal models

The synthetic grape juice medium, SGM, (Mitchell et al., 2004; Belli et al., 2005; Leong et al., 2006), contained: 70 g D(+)-Glucose; 30 g D(-)-Fructose; 7 g L(+)-Tartaric acid; 10 g L(-)-Malic acid; 0.67 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.67 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.75 g; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.15 g; NaCl 0.0015 g; CaCl<sub>2</sub> 0.15 g; CuCl<sub>2</sub> 0.0075 g; FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.021 g; ZnSO<sub>4</sub> 0.0075 g and (+)-Catechin 0.05 g; agar 25 g; water 1000 ml; and pH 4.2 was adjusted with NaOH (M).

Grape juice agar medium, GJA, (Pateraki et al., 2007) was also used for validation of the cardinal models. The grape juice obtained from a local producer (Benoit Porteilla, Dellet, France) was processed from Bio grapes of cv Chardonnay. Agar, 25 g, was added to the grape juice, ca. 1000 ml, adjusted to pH 4.2 and sterilized at 121 °C for 20 min. The  $a_w$  of the unmodified SGM and GJA was 0.985. Validation experiments were carried out by varying simultaneously temperature (7 to 25 °C) and  $a_w$  (0.90 to 0.985). The combinations tested were (7/0.95, 0.975, 0.985); (15/0.925, 0.95, 0.975, 0.985); (20, 25/0.90, 0.925, 0.95, 0.975, 0.985).

### 2.4. Growth measurements

Growth was evaluated daily by measurement of the increase of the fungal colony along two perpendicular diameters (Trinci, 1969; Gervais et al., 1988). Radius vs. time was plotted and radial growth rates ( $\mu$ , mm day<sup>-1</sup>) were evaluated from the slopes by linear regression. All experiments were carried out in triplicate at least for a maximum period of 6 weeks. Prior to fitting, a square-root transformation was used to stabilise the variance of  $\mu$  (Dantigny and Bensoussan, 2008).

### 2.5. Cardinal models

The effect of temperature on the radial growth rate was modelled by the cardinal model with inflection as described by Rosso et al. (1993).

$$\mu^{0.5} = [\mu_{opt}\gamma(T)]^{0.5} = \left[ \frac{(T-T_{max})(T-T_{min})^2}{(T_{opt}-T_{min})(T_{opt}-T_{min})(T-T_{opt})-(T_{opt}-T_{max})(T_{opt}+T_{min}-2T)} \right]^{0.5} \quad (1)$$

The effect of water activity on the radial growth rate was modelled by the cardinal model with inflection as modified by Sautour et al. (2001)

$$\mu^{0.5} = [\mu_{opt}\gamma(a_w)]^{0.5} = \left[ \frac{(a_w-1)(a_w-a_{w_{min}})^2}{(a_{w_{opt}}-a_{w_{min}})((a_{w_{opt}}-a_{w_{min}})(a_w-a_{w_{opt}})-(a_{w_{opt}}-1)(a_{w_{opt}}+a_{w_{min}}-2a_w))} \right]^{0.5} \quad (2)$$

Model parameters were estimated by means of non-linear regression software based upon the Levenberg–Marquardt algorithm (SlideWrite 5.0, Advanced Graphics Software, Carlsbad, CA, USA) as described previously (Dantigny, 1998).

### 2.6. Validation of the cardinal models

The combined effect of temperature and water activity was described according to the gamma-concept (Zwietering et al., 1992).

$$\mu = \mu_{opt}\gamma(T)\gamma(a_w) \quad (3)$$

For each combination of temperature and water activity, the optimum growth rate  $\mu_{opt}$  was calculated from the observed growth



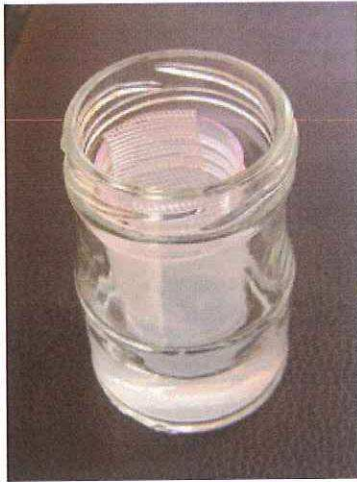


Fig. 1. Experimental set-up. Once the inoculated berry is placed on the grid, the device is closed during the incubation, the top is removed for allowing observation.

rate,  $\mu_{\text{observed}}$  according to  $\mu_{\text{opt}} = \frac{\mu_{\text{observed}}}{\gamma(T)\gamma(a_w)}$  and the predicted growth rate,  $\mu_{\text{predicted}}$ , from the mean,  $\overline{\mu_{\text{opt}}}$ , according to  $\mu_{\text{predicted}} = \overline{\mu_{\text{opt}}}\gamma(T)\gamma(a_w)$ .

Comparison between the predicted growth rate  $\mu_{\text{predicted}}$ , and the observed growth rate  $\mu_{\text{observed}}$ , was assessed by using the accuracy,  $A_f$  and the bias  $B_f$  factors (Ross, 1996).

$$A_f = 10^{(\sum |\log(\mu_{\text{predicted}} / \mu_{\text{observed}})|) / n} \quad (4)$$

$$B_f = 10^{(\sum \log(\mu_{\text{predicted}} / \mu_{\text{observed}})) / n} \quad (5)$$

## 2.7. Determination of the optimal growth rate on berries

### 2.7.1. Experimental set-up

The experimental set-up was made from an inner sterile plastic tube (2.9 cm diameter  $\times$  6.8 cm height) placed in an autoclaved glass jar (4.2 cm diameter  $\times$  8.3 cm height), Fig. 1. A grid was placed on the inner tube to hold the berry. Both the jar and the tube were filled with a glycerol/water solution,  $a_w$  identical to that of the berries, up to ca. 2 cm height to maintain constant the relative humidity throughout the experiments.

### 2.7.2. Inoculation of berries

Table grape berries were dipped in an ethanol 35% (vol/vol) solution for 1 min at ambient temperature (Mlikota Gabler et al., 2005) then washed with sterile distilled water and dried. Each berry was cut into half. One half was used for determination of  $a_w$  and pH, the other half for inoculation. "Red Globe" cultivars are a thick skinned red raisin from Chile (pH  $3.87 \pm 0.02$ ;  $a_w$   $0.975 \pm 0.001$ ). 10  $\mu$ l of the spore suspension was inoculated close to the pedicel of the berry. Once inoculated the experimental devices were closed and incubated at 15 °C. Eight "half" berries were tested for each species.

### 2.7.3. Observation of fungal growth

Berries were not removed from the experimental devices. Once a visible mycelium was shown, pictures were taken twice a day by a digital camera and analysed using Matrox Inspector 2.2 (Matrox Electronics Systems Ltd, Dorval, Canada). The radius of the colony was plotted against time. The radial growth rate was evaluated from the slope of the straight line.

## 3. Results

### 3.1. Cardinal values

The cardinal temperatures are reported in Table 1. The moulds exhibited minimum temperatures for growth close to the freezing point. However, they were characterised by significantly different  $T_{\text{min}}$  values. *Penicillium expansum* was the most psychrotrophic fungus,  $T_{\text{min}} = -4.4$  °C. Optimal temperatures were in the range 20–25 °C for the fungi. *Botrytis cinerea* was characterised by a  $T_{\text{opt}}$  value less than *P. expansum*. At 0.99  $a_w$  and  $T_{\text{opt}} = 21.4$  °C, the radial growth rate of *B. cinerea* on PDA medium was equal to 12.9 mm day<sup>-1</sup>, Table 1. This value was close to the true optimum growth rate on PDA medium that would have been obtained at 0.988  $a_w$ , the optimum water activity for *B. cinerea*. In contrast, at 0.988  $a_w$ , the optimum growth rate was 9.97 mm day<sup>-1</sup>, although the incubation temperature, 25 °C, was different from the optimal one, 21.4 °C Table 2.

At 0.99  $a_w$ , the optimum growth rate equalled 2.40 mm day<sup>-1</sup> for *P. expansum*, Table 1. This value was significantly different from the  $\mu_{\text{opt}}$  value of 2.86 (Table 2) because  $a_{w \text{ opt}}$  for this species was equal to 0.981. The true  $\mu_{\text{opt}}$  value on PDA medium would have been obtained at 0.981  $a_w$ , 23.9 °C for *P. expansum*.

*B. cinerea* was unable to grow below 0.895  $a_w$ , Table 2. In contrast, *P. expansum* exhibited  $a_{w \text{ min}}$  value of 0.856. The quality of fit of the experimental data by the predictive models was shown, Fig. 2. The low RMSE values demonstrated the suitability of the models for describing the effects of temperature and  $a_w$  on the radial growth rates. RMSE values were less for the 4 parameters CMI for temperature than the 3 parameters CMI for water activity.

### 3.2. Validation of the predictive model

In contrast to the estimation of the cardinal parameters, the validation of the predictive model was carried out by varying simultaneously temperature and  $a_w$ . The simulated grape juice medium, SGM and the grape juice agar, GJA were used for this validation. The bias and accuracy factors are reported for *B. cinerea* and *P. expansum*, Table 3. The bias factors were close to 1 for the moulds. In contrast, accuracy factors were much more dependent on the species and on the medium. *B. cinerea* was characterised by accuracy factors greater than *P. expansum*, particularly on SGM,  $B_f = 1.29$ . Bias factors were less than 1.2 for *P. expansum* on this medium. A great dispersion of the experimental data can be observed each side of the straight line  $y = x$  for *B. cinerea*, Fig. 3(a). Dispersion was less for *P. expansum*, Fig. 3(c) as suggested by a smaller accuracy factor than *B. cinerea* on SGM.

Accuracy factors on GJA were less than those calculated on SGM, Table 3. *P. expansum* was characterised by the lowest  $A_f$  value on GJA. A noticeable dispersion of the data was observed for growth rates greater than 4 mm day<sup>-1</sup>, Fig. 3(d). Whereas the maximum growth

Table 1

Estimations of the cardinal temperatures and optimal growth rate on Potato Dextrose Agar at 0.99  $a_w$ , 95% confidence intervals in brackets.

Mould	$T_{\text{min}}$ (°C)	$T_{\text{opt}}$ (°C)	$T_{\text{max}}$ (°C)	$\mu_{\text{opt}}$ (mm d <sup>-1</sup> )	RMSE
<i>Botrytis cinerea</i>	-1.39 [-2.30 ; -0.49]	21.4 [20.8 ; 22.0]	29.1 [28.8 ; 29.3]	12.9 [12.4 ; 13.4]	0.057
<i>Penicillium expansum</i>	-4.40 [-6.21 ; -2.58]	23.9 [22.9 ; 24.9]	32.5 [31.4 ; 33.7]	2.40 [2.25 ; 2.55]	0.048



**Table 2**  
Estimations of the cardinal water activities and optimal growth rate on Potato Dextrose Agar at 25 °C. 95% confidence intervals in brackets.

Mould	$a_w$ min	$a_w$ opt	$\mu_{opt}$ (mm d <sup>-1</sup> )	RMSE
<i>Botrytis cinerea</i>	0.895 [0.891 ; 0.900]	0.988 [0.983 ; 0.993]	9.97 [8.74 ; 11.2]	0.136
<i>Penicillium expansum</i>	0.856 [0.850 ; 0.861]	0.981 [0.979 ; 0.983]	2.86 [2.66 ; 3.07]	0.102

rates were approximately, 7 and 3 mm day<sup>-1</sup> on SGM, the maxima were ca. 12 and 4.5 mm day<sup>-1</sup> on GJA for *B. cinerea* and *P. expansum*, respectively.

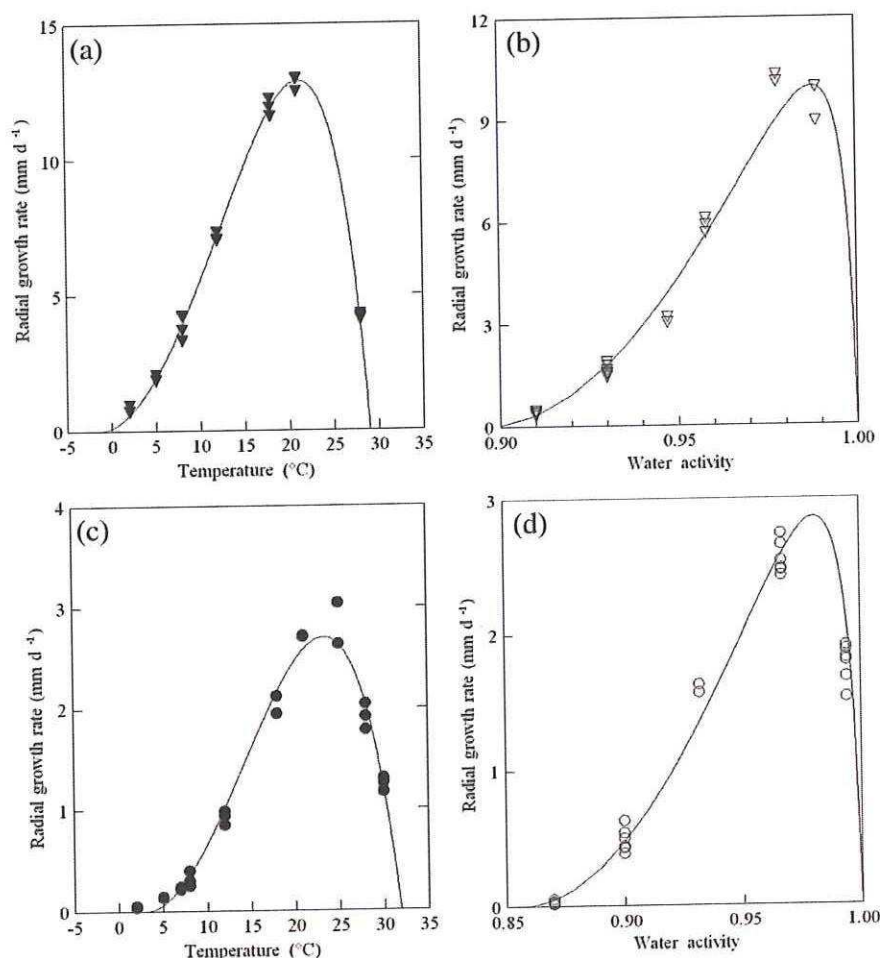
### 3.3. Determination of $\mu_{opt}$ on grape berries

The optimum growth rate was very much dependant on the medium, as demonstrated in the previous section. The growth rate was determined on Red Globe berries at 15 °C. An example of pictures was shown on Fig. 4 for *P. expansum*. The growth rate of the colony was simply evaluated by plotting the largest distance between the point of inoculation and the edge of the colony. In fact the growth is isotropic and it was not necessary to assess growth in another direction than the one quantified. In contrast to the previous experiments carried out in dishes it was not necessary to transform the diameter of the colony into the radius. At 15 °C and 0.975  $a_w$ , the measured radial growth rates were 5.41 and 2.35 mm day<sup>-1</sup> for *B.*

*cinerea* and *P. expansum*, respectively. By using the gamma values for T and  $a_w$ , the optimum growth rates on Red Globe berries were estimated to 8.46 and 4.19 mm day<sup>-1</sup> for *B. cinerea* and *P. expansum*, respectively, Table 4. The optimal growth rate calculated on “Red Globe” berries for *B. cinerea* was greater than the value obtained on Synthetic Grape juice Medium but was less than the values shown on Potato Dextrose Agar and Grape Juice Agar. In contrast,  $\mu_{opt}$  determined on “Red Globe” berries for *P. expansum* was greater than the value obtained on PDA medium and on SGM. The difference between the optimum growth rates determined on “Red Globe” berries and on Grape Juice Agar was not significant.

## 4. Discussion

*Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* examined in this study are psychrotrophic. Both were capable of growing at temperatures close to the freezing point. This observation is in accordance with the



**Fig. 2.** Effects of temperature and  $a_w$  on the radial growth rate of *Botrytis cinerea* (a) and (b); *P. expansum* (c) and (d). The effects of temperature and water activity were assessed on Potato Dextrose Agar at 0.99  $a_w$  and 25 °C, respectively. The cardinal model with inflection (CMI) as described by Rosso et al. (1993) and the CMI as modified by Sautour et al. (2001) were used for fitting the experimental data for temperature and  $a_w$ , respectively.

**Table 3**

Mathematical indices used to validate the gamma-functions for describing the effects of water activity and temperature on the growth of some moulds on SGM and GJA.

Mould	SGM		GJA	
	$B_f$	$A_f$	$B_f$	$A_f$
<i>Botrytis cinerea</i>	1.06	1.29	1.02	1.18
<i>Penicillium expansum</i>	1.02	1.15	1.01	1.11

SGM: simulated grape juice medium, GJA: grape juice agar,  $B_f$ : bias factor,  $A_f$ : accuracy factor.

minimum temperature for growth reported in the literature (Table 5). By comparing the optimum temperature for growth reported in the literature for these species, it appeared that  $T_{opt}$  was less for *B. cinerea* than for *P. expansum*. The estimation of  $T_{opt}$  for *B. cinerea* 21.4 °C, was significantly different from that for *P. expansum* 23.9 °C, thus strengthening this assumption. The ability of *P. expansum* to grow at a higher temperature than *B. cinerea* was suggested by our study. However, this was not clearly demonstrated by other studies (Table 5) and should be confirmed.

None of the species studied in this paper were xerophilic, the minimum  $a_w$  for growth were greater than 0.85. However, it was shown that *P. expansum* exhibited growth at reduced water activities. This was not the case for *B. cinerea* characterised by a minimum of 0.895  $a_w$ . This value is in accordance with the minimum  $a_w$  reported by Jarvis (1977), but less than values reported by other studies (Table 5). In contrast, minimum  $a_w$  estimated in this study was greater

than the values reported in the literature for *P. expansum*. Differences may be due to the origin of the isolates. The species described in this study were isolated from grape berries characterised by water activities in the range 0.980–0.985. There is no advantage for strains isolated from grapes to be able to grow at reduced  $a_w$ . Conversely, the isolated species were characterised by optimum  $a_w$ 's close to that of grape berries. The optimum  $a_w$  for *P. expansum* 0.981 was however less than that of *B. cinerea* 0.988, suggesting that the former species was more susceptible to contaminate mature berries or berries with a greater sugar content than the latter species.

The optimum growth rate of *B. cinerea* on PDA medium at 25 °C ranged from 6.75 to 7.60 mm day<sup>-1</sup> (Lahlali et al., 2007). In contrast, in the same conditions, our strain exhibited a greater optimum value of 9.97 mm day<sup>-1</sup>. This observation strengthened previous observation that isolates of *B. cinerea* showed variation in growth rates (Mirzaei et al., 2009). Similarly, McCallum et al. (2002) divided the strains of *P. expansum* in fast and weak growers. At 25 °C, the optimum for growth was 2.86 mm day<sup>-1</sup> for our isolate on PDA medium as compared to 3.70 mm day<sup>-1</sup> for *P. expansum* MUM 00.01 isolated from apples (Baert et al., 2007b). However, comparison was difficult due to the growth rate of the MUM 00.01 isolate was determined on an apple analogue, not on PDA medium. Respective cardinal values for these species did not vary greatly depending on the isolates. However, care should be taken with the minimum  $a_w$  because this value may depend on the nature of the depressant (Gibson et al., 1994). The optimum growth rate was greatly impacted by both the isolate and the medium.

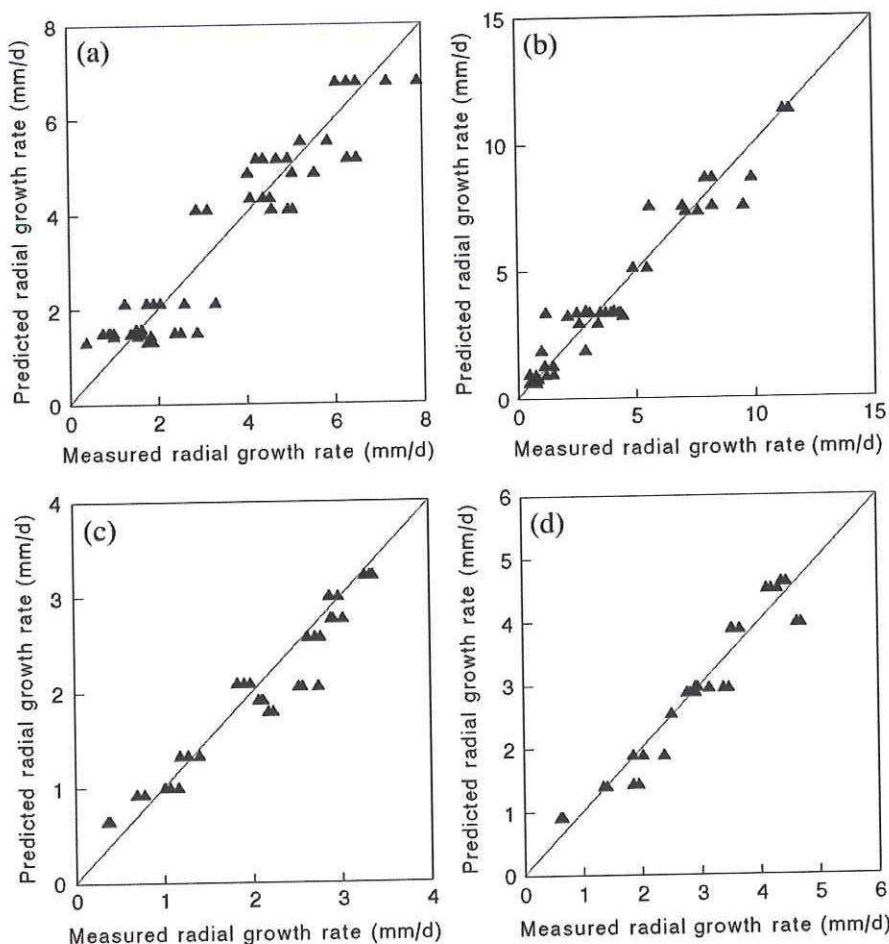


Fig. 3. Validation of the predictive model for the effect of water activity and temperature on the growth of (a) *Botrytis cinerea* on simulated grape juice medium, SGM ; (b) *B. cinerea* on grape juice agar, GJA; (c) *P. expansum* on SGM and (d) *P. expansum* on GJA.



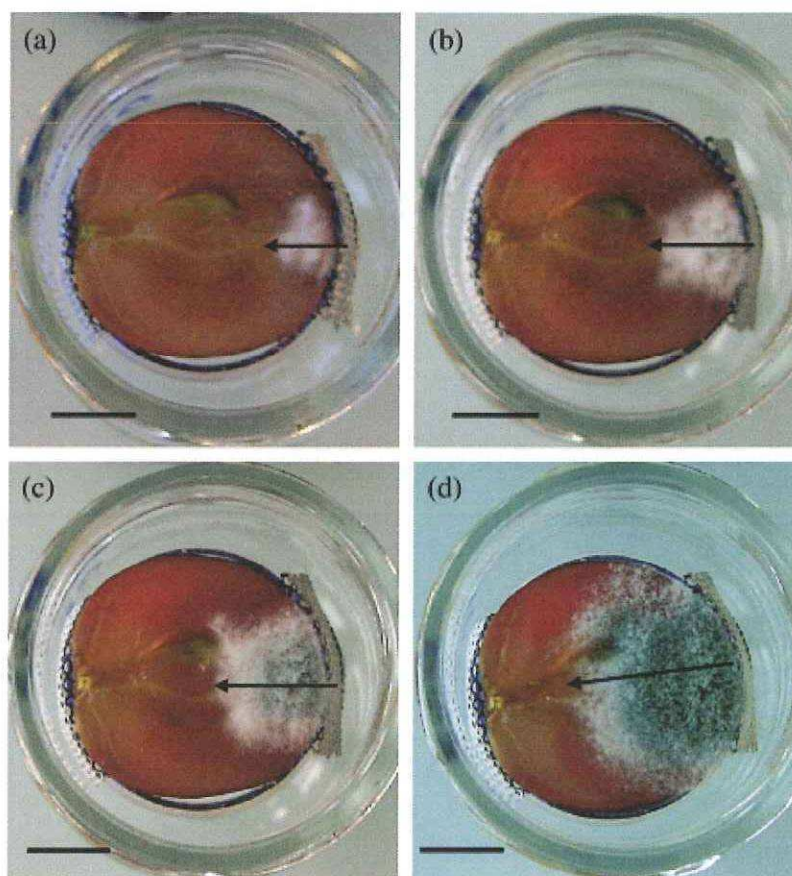


Fig. 4. Growth of *Penicillium expansum* on a grape berry of "Red Globe" cultivars at 15 °C. The axis for the determination of the radial growth rate was from the right hand side to the left hand side of the grid. The arrows indicated the radius of the colony at (a) 72 h, (b) 96 h, (c) 120 h and (d) 168 h. Bars = 1 cm. By plotting the radius of the colony (mm) vs. time (day) the slope of the linear regression was  $\mu = 2.67 \text{ mm day}^{-1}$  ( $r^2 = 0.993$ ).

CMI's fitted the experimental data with a good accuracy. A better quality of fit was achieved using CMI for temperature than the CMI for water activity. But, the CMI for temperature is a 4-parameters model compared to the 3-parameters CMI model for  $a_w$ . In the latter model, the maximum  $a_w$  was substituted for 1. As suggested previously (Sautour et al., 2001), there is no penalty in stating  $a_{w \text{ max}} = 1$  because none of the studied species was xerophilic.

Internal validation of a predictive model for the effect of  $a_w$  on growth of *Byssoschlamys fulva*, *Neosartorya fischeri* and *Talaromyces avellaneus* was carried out by Valík and Piecková (2001). Bias factors,  $B_f$  ranged from 1.007 to 1.014. To validate a predictive model for the effect of temperature and  $a_w$  on the growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*, experiments were repeated for both isolates using the same temperatures but  $a_w$ 's different to those examined for estimating model parameters (Samapundo et al., 2005). Validation performed on the same medium than model fitting showed  $B_f$  in the range 1.042–1.054 and 0.978–1.002 for a polynomial and the linear Arrhenius–Davey model (Davey, 1989), respectively. The same order

of magnitude (0.93–1.10) was found for  $B_f$  values determined for the validation of a predictive model for the effect of temperature on the growth of *P. expansum* on an apple analogue (Baert et al., 2007a). In that study, model parameters were estimated at temperatures different from those chosen for validating the model, but the apple analogue was the same. When validation was performed on real apples,  $B_f$  values were in the range 0.64–0.81. The authors suggested that difference between predictions in the apple analogue and on real apple was most probably due to the apple itself. Predicted values were higher than the observed ones ( $B_f$  1.19–1.31) for an external validation of a predictive model for the effect of temperature and  $a_w$  on growth of *A. carbonarius* (Tassou et al., 2007). The difference was attributed partly to inherent differences in the observed growth rates of various strains of *A. carbonarius*. It was demonstrated through these examples that  $B_f$  values different from one (say less than 0.8 or greater than 1.2) were due to external validation carried out on different media or different strain. In the present study, model parameters were estimated on PDA while the validation was conducted on grape analogues. The objective was to validate the gamma-concept for describing the combined effects of temperature and  $a_w$  on growth. Accordingly, the environmental factors varied simultaneously for validation whereas they varied independently for model fitting. However, the optimum growth rate estimated on PDA medium was not used for validation.  $\mu_{\text{opt}}$  values for both the analogues were calculated *a posteriori*. This protocol probably explained why  $B_f$  values were in the range 1.01–1.06 in the present study.

Since the  $B_f$  provides no indication of the average accuracy of the estimates, the accuracy factor  $A_f$  was also calculated. The  $A_f$  averages

Table 4

Determination of the optimal growth rates,  $\mu_{\text{opt}}$ , for some moulds on grape berries of "Red Globe" cultivars, Chile (pH  $3.87 \pm 0.02$ ;  $a_w$   $0.975 \pm 0.001$ ). Radial growth rate,  $\mu$ , was measured at 15 °C.

Mould	$\mu$ (mm d <sup>-1</sup> )	$\gamma(T)$	$\gamma(a_w)$	$\mu_{\text{opt}}$ (mm d <sup>-1</sup> )
<i>Botrytis cinerea</i>	5.41 ± 1.08	0.748	0.855	8.46 ± 1.69
<i>Penicillium expansum</i>	2.35 ± 0.24	0.591	0.948	4.19 ± 0.46

Mean ± standard deviation.



Table 5

Cardinal values reported in the literature for *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*.

Mould	T <sub>min</sub> (°C)	T <sub>opt</sub> (°C)	T <sub>max</sub> (°C)	a <sub>w min</sub>	a <sub>w opt</sub>	Reference
<i>Botrytis cinerea</i>	-2 ; 5	22 ; 25	28 ; 35	0.93 ; 0.95 0.90 0.93	0.985 ; 0.99	Domsch et al. (1980)
	-2	22 ; 25	30 ; 33			Panasenko (1967)
						Jarvis (1977)
						Snow (1949)
<i>Penicillium expansum</i>	-6			0.83		Lahlali et al. (2007)
	-2	23	30	0.83		Brooks and Hansford (1923)
	-3	25 ; 26	33 ; 35	0.82		Mislivec and Tuite (1970)
				0.83		Panasenko (1967)
		24 ; 27	32.5 ; 34			Hocking and Pitt (1979)
	-2 ; -0.5					Baert et al. (2007a)
						Baert et al. (2007b)

the distance between each point and the line of equivalence as a measure of how close, on average, predictions are to observations. The larger the value, the less accurate is the average estimate (Ross, 1996). Very large accuracy factors were obtained for validation/modelling performed on apple analogue/apple  $A_f$  1.26–1.38 (Baert et al., 2007a) and on different strains  $A_f$  1.20–1.61 (Tassou et al., 2007). For validation with the same strain and medium, although under different environmental conditions, accuracy factors were less, 1.098–1.122 (Samapundo et al., 2005) and 1.05–1.19 (Baert et al., 2007a). The accuracy factors determined in the present study (1.11–1.29) are comparable to the latter ones. Larger  $A_f$  values may have been obtained by using the  $\mu_{opt}$  value found for growth on PDA for validation on the grapes analogues. Model proved less accurate for *B. cinerea* than for *P. expansum*. This may be due to difficulties in measurement accurately the diameter of *B. cinerea* colonies, especially at reduced temperatures, due to loose mycelium. Eventually, accuracy factors were less for the grape juice agar GJA than those for the synthetic grape juice medium SGM. Slow growth observed on SGM may be due to a ratio C/N ca. 1/30, thus leading to a possible nitrogen limitation. Therefore GJA should be preferred.

The maximum radial growth rates obtained on GJA were greater than the  $\mu_{opt}$  values calculated on berries. This difference observed for *B. cinerea* and *P. expansum* maybe partly due to a lower pH of "Red Globe" berries than that of grape juice agar. It was reported that *B. cinerea* can grow from pH 2 to 8 (Jarvis, 1977), but no data was available for *P. expansum*. Another explanation would be the cultivar of the grape juice "Chardonnay" was different from that one of the berries "Red Globe". It would be of interest to determine the optimal growth rates on Pinot berries in future studies, because the species were isolated from this cultivar. Eventually, in contrast to the Bio "Chardonnay", inhibitory molecules may be present in the "Red Globe", thus resulting in a slower growth rate on the berries than on the grape juice agar. The extent of the growth of *B. cinerea* on berry was difficult to assess due to loose mycelium at the periphery of the colony. The determination of the optimal growth rates was performed on "Red Globe" dark berries. The observation of mycelium on white berries would require the use of colorants that do not limit growth. *B. cinerea* is a phytopathogenic fungus able to penetrate healthy plant tissues (Espino et al., 2005). This fungus secretes a high number of hydrolytic enzymes that are important for penetration of the host cuticular, pectic and cellulosic layers. After the cuticular barrier is breached, various cellulases (i.e., endo- $\beta$ -1,4-glucanases, cellobiohydrolases, exo- $\beta$ -1,4-glucanases and  $\beta$ -glucosidases) degrade the primary cell wall and middle lamella of host plant parenchyma to allow penetration of pathogen hyphae (Touzani and Donèche, 1996; Kapat et al., 1998). Therefore, *B. cinerea* can be grown directly on the cuticle of berries. In contrast, *P. expansum* cannot penetrate plant tissues and it was necessary to cut the berries in half to allow this species to grow. *P. expansum* should be considered as an opportunist fungus able to spoil damaged berries or berries already infested by *B. cinerea*.

## 5. Conclusions

This study demonstrated the usefulness of the gamma concept for validating predictive models in foods or agricultural products. In contrast to the cardinal values, it was shown that the optimum growth rates depended strongly on the strain and the medium. In the present study, grape analogues were used to validate the combined effects of temperature and water activity on growth, then the optimum growth rate was determined on grape berries once the model validated. This approach allowed validation of the model over a wide range of variation of temperature and water activity, but also the estimation of the optimal growth rate on grape berries under non optimal conditions. In fact the temperature of 15 °C increased the duration of the experiments and more observations of the mycelium could be done. This facility was particularly useful for the examination of fast growing fungi on small fruits. The isotropic nature of fungal growth was also taken into account. The inoculation was done at the edge of the berries, not at the centre. Eventually, the proposed experimental device can be used for determining the optimal growth rate of fungi on the berries of other fruits.

## Acknowledgements

Elodie Bourbon and Fiona Foy are gratefully acknowledged for technical assistance. This work was supported by the National Program on earthy/musty taste of wine (AGRIMER, Paris, France) project No. 01 04 21 08 0004 21.

## References

- Abrunhosa, L., Paterson, R.R.M., Kozakiewicz, Z., Lima, N., Venâncio, A., 2001. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology* 32, 240–242.
- Baert, K., Valero, A., de Meulenaer, B., Samapundo, S., Morshed Ahmed, M., Bo, L., Debevere, J., Devlieghere, F., 2007a. Modeling the effect of temperature on the growth and lag phase of *Penicillium expansum* in apples. *International Journal of Food Microbiology* 118, 139–150.
- Baert, K., Devlieghere, F., Flyps, H., Osterlinck, M., Morshed Ahmed, M., Rajković, A., Veriinden, B., Nicolaï, B., Debevere, J., de Meulenaer, B., 2007b. Influence of storage conditions of apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology* 119, 170–181.
- Barkai-Golan, R., 2001. *Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables*. Development and control. Elsevier Science, B.V. Amsterdam, The Netherlands.
- Batthey, A.S., Duffy, S., Schaffner, D.W., 2001. Modelling mould spoilage in cold-filled ready-to-drink beverages by *Aspergillus niger* and *Penicillium spinulosum*. *Food Microbiology* 18, 521–529.
- Bellí, N., Ramos, A.J., Coronas, I., Sanchis, V., Marín, S., 2005. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. *Journal of Applied Microbiology* 98, 839–844.
- Brocklehurst, T., 2004. Challenge of Food and the Environment. In: McKellar, R.C., Lu, X. (Eds.), *Modeling microbial responses in food*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 197–232.
- Brooks, F., Hansford, C.G., 1923. Mould growth upon cold-stored meat. *Transactions of the British Mycological Society* 8, 113–142.
- Dantigny, P., 1998. Dimensionless analysis of the microbial growth rate dependence on sub-optimal temperatures. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 21, 215–218.

- Dantigny, P., Bensoussan, M., 2008. The logarithmic transformation should be avoided for stabilising the variance of mould growth rate. *International Journal of Food Microbiology* 121, 225–228.
- Davey, K.R., 1989. A predictive model for the combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. *The Journal of Applied Bacteriology* 67, 483–488.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.-H., 1980. *Compendium of Soil Fungi*, 2 vols. Academic Press, London.
- Emmett, R.W., Harris, A.R., Taylor, R.H., McGehan, J.K., 1992. Grape Diseases and Vineyard Protection. In: Coombe, B.G., Dry, P.R. (Eds.), *Viticulture: Practices*, Vol. 2. Winetitles, Adelaide, pp. 232–278.
- Espino, J.J., Brito, N., Noda, J., González, C., 2005. *Botrytis cinerea* endo- $\beta$ -1, 4-glucanase Cel5A is expressed during infection but is not required for pathogenesis. *Physical and Molecular Plant Pathology* 66, 213–221.
- García, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S., 2009. Predicting mycotoxins in foods: a review. *Food Microbiology* 1–13.
- Gervais, P., Fasquel, J.-P., Molin, P., 1988. Water relations of spore germination. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29, 586–592.
- Gibson, A.M., Baranyi, J., Pitt, J.I., Eyles, M.J., Roberts, T.A., 1994. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology* 23, 419–431.
- Hewitt, W.B., 1988. Berry Rots and Raisin Moulds. In: Pearson, R.G., Goheen, A.C. (Eds.), *Compendium of Grapes Diseases*. The American Phytopathological Society, Minnesota, pp. 26–28.
- Hocking, A.O., Pitt, J.I., 1979. Water relations of some *Penicillium* species at 25 °C. *Transactions of the British Mycological Society* 73, 141–145.
- Jarvis, W.R., 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* species: Taxonomy, Physiology, and Pathogenicity. Canadian Department of Agriculture, Ottawa, Monograph N°15, 195.
- Kapat, A., Zimand, G., Elad, Y., 1998. Biosynthesis of pathogenicity hydrolytic enzymes by *Botrytis cinerea* during infection of bean leaves and *in vitro*. *Mycological Research* 102, 1017–1024.
- Lahlali, R., Serrhini, M.N., Friel, D., Jijakli, M.H., 2007. Predictive modelling of temperature and water activity (solutes) on the *in vitro* radial growth of *Botrytis cinerea* Pers. *International Journal of Food Microbiology* 114, 1–9.
- Leong, S.L., Hocking, A.D., Scott, E.S., 2006. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *International Journal of Food Microbiology* 110, 209–216.
- Lichter, A., Zutkhy, Y., Sonogo, L., Dvir, O., Kaplunov, T., Sarig, P., Ben-Arie, R., 2002. Ethanol controls postharvest decay of table grapes. *Postharvest Biology and Technology* 24, 301–308.
- Marín, S., Hodzic, I., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2008. Predicting the growth/no growth boundary and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* in pistachio nuts. *Food Microbiology* 25, 683–689.
- Mattheis, J.P., Roberts, R.G., 1992. Identification of geosmin as a volatile metabolite of *Penicillium expansum*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3170–3172.
- McCallum, J.L., Tsao, R., Zhou, T., 2002. Factors affecting patulin production by *Penicillium expansum*. *Journal of Food Protection* 41, 885–890.
- Mirzaei, S., Goltapeh, E.M., Shams-Bakhsh, M., Safaie, N., Chaichi, M., 2009. Genetic and phenotypic diversity among *Botrytis cinerea* isolates in Iran. *Journal of Phytopathology* 157, 474–482.
- Mislivec, P.B., Tuite, J., 1970. Temperature and relative humidity requirements of species of *Penicillium* isolated from yellow dent corn. *Mycologia* 62, 75–88.
- Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D., Magan, N., 2004. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology* 97, 439–445.
- Mlikota Gabler, F., Smilanick, J.L., Ghosop, J.M., Margosan, D.A., 2005. Impact of postharvest hot water or ethanol treatment of table grapes on gray mold incidence, quality, and ethanol content. *Plant Disease* 89, 309–316.
- Nelson, K.E., 1985. *Harvesting and Handling California Table Grapes for Market*. Univ. Calif. Div. Agric. Sci. Publ. N° 1913.
- Panasenko, V.T., 1967. Ecology of microfungi. *Botanical Reviews* 33, 189–215.
- Pateraki, M., Dekanea, A., Mitchell, D., Lydakakis, D., Magan, M., 2007. Influence of sulphur dioxide, controlled atmospheres and water availability on *in vitro* germination, growth and ochratoxin A production by strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *Postharvest Biology and Technology* 44, 141–149.
- Ross, T., 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Microbiology* 81, 501–508.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P., 1993. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *Journal of Theoretical Biology* 162, 447–463.
- Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Geeraerd, A.H., van Impe, J.F., Debever, J.M., 2005. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. *International Journal of Food Microbiology* 105, 35–52.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filtenborg, O., 2004. *Introduction to food and airborne fungi*, 7th ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands.
- Sautour, M., Dantigny, P., Divies, C., Bensoussan, M., 2001. A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water activity. *International Journal of Food Microbiology* 67, 63–69.
- Snow, D., 1949. The germination of mould spores at controlled humidities. *The Annals of Applied Biology* 36, 1–13.
- Tassou, C.C., Panagou, E.Z., Natskoulis, P.I., Magan, N., 2007. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth of two ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from Greek wine grapes. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2267–2276.
- Tassou, C.C., Natskoulis, P.I., Magan, N., Panagou, E.Z., 2009. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production boundaries of two *Aspergillus carbonarius* isolates on a simulated grape juice medium. *Journal of Applied Microbiology* 107, 257–268.
- Touzani, A., Donèche, B., 1996. Production et propriétés du complexe cellulosique du *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Botany* 74, 486–491.
- Trinci, A.P.J., 1969. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *Journal of General Microbiology* 57, 11–24.
- Valík, L., Piecková, E., 2001. Growth modelling of heat-resistant fungi: the effect of water activity. *International Journal of Food Microbiology* 63, 11–17.
- Zwietering, M.H., Wijtzes, T., de Wit, J.C., van't Riet, K., 1992. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *Journal of Food Protection* 55, 973–979.

### 3. II. 2. CONCLUSIONS

Les modèles de croissance ont permis de déterminer les températures et les activités de l'eau cardinales pour les souches testées. *B. cinerea* et *P. expansum* sont des souches psychotropes car elles peuvent se développer à des températures proches de 0°C. Contrairement au cas de la température, ces souches ne peuvent pas se croître à des activités de l'eau très basses. Le taux de croissance est un paramètre qui dépend du milieu tandis que les valeurs cardinales sont propres à la souche. Cela explique le choix du milieu PDA, un milieu de base utilisé pour la croissance des champignons ainsi que la variation indépendante de la température et de l'activité de l'eau pour déterminer les valeurs cardinales. Les paramètres obtenus lors de cette étude présentent un grand intérêt pour la maîtrise de la croissance fongique dans le vignoble.

Afin de vérifier si un modèle peut être appliqué aux situations réelles, celui-ci doit être validé. Le choix du milieu pour la validation est une étape importante. La faible croissance observée sur jus de raisin synthétique a été due à un ratio C/N de 1/30, conduisant ainsi à une limitation de l'azote possible. Par conséquent le jus de raisin naturel doit être préféré. Nous avons pu valider les modèles de croissance pour *B. cinerea* et *P. expansum*, sur jus de raisin naturel. Cette validation nous a permis de décrire l'effet combiné de la température et de l'activité de l'eau sur la croissance de *B. cinerea* et *P. expansum* sur baies de raisins, un produit dont l'activité de l'eau ne peut pas être changée. On a pu calculer le taux de croissance optimal de nos souches, sur baie de raisin, en supposant que les conditions de température et activité de l'eau étaient optimales.

Cette étude a montré que les modèles de croissance utilisant les valeurs cardinales peuvent être validés sur des produits agro-alimentaires sur une large gamme de température et d'activité de l'eau.

### **3. III. INFLUENCE DU CUIVRE SUR LE TEMPS DE LATENCE ET LE TAUX DE CROISSANCE RADIALE DE *PENICILLIUM EXPANSUM* ET *BOTRYTIS CINEREA***

#### **3. III. 1. Présentation**

Le cuivre semble avoir une influence importante sur la production de géosmine. La température ne peut pas être contrôlée dans le vignoble, tandis que le cuivre en tant que fongicide, est rajouté par l'homme. Dans la suite de ce travail nous nous sommes intéressés à l'effet du cuivre sur la croissance des champignons contaminants de la vigne, *B. cinerea* et *P. expansum*.

L'approche expérimentale consiste à cultiver ces deux champignons sur un milieu classique, milieu gélosé à l'extrait de pomme de terre, supplémenté en cuivre (de 0 à 8 mM). Dans un premier temps l'objectif est d'étudier la croissance des champignons sous l'influence du cuivre, par la mesure du diamètre. A partir de cette croissance on peut déduire le temps de latence et donc, voir l'effet du cuivre sur la germination de spores de *B. cinerea* et *P. expansum*.

La modélisation de la croissance a permis l'estimation du taux de croissance optimal ( $\mu_{opt}$ ) et de la concentration en cuivre pour laquelle  $\mu = \mu_{opt} / 2$ , le  $Cu_{50}$ . Le modèle utilisé pour modéliser le temps de latence a été différent de celui pour la croissance, dû au comportement de *Botrytis cinerea* en fonction du cuivre (forme de courbe différente d'une courbe concave ou convexe obtenue généralement avec un modèle d'inhibition de la croissance). Un temps de latence infini est obtenu en absence de la croissance, donc la modélisation du temps de latence a permis l'estimation du MIC (concentration minimale inhibitrice en cuivre).



Manuscript Number: FOODRES-D-11-00594

Title: Modelling the inhibitory effect of copper sulphate on the growth of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*

Article Type: Research Article

Keywords: copper; inhibition; fungi; mould; *Penicillium expansum*; *Botrytis cinerea*; MIC

Corresponding Author: Dr Philippe Dantigny,

Corresponding Author's Institution: Agro-Sup Dijon

First Author: Daniela Judet-Correia

Order of Authors: Daniela Judet-Correia; Claudine Charpentier; Maurice Bensoussan; Philippe Dantigny

Abstract: Copper is the active component of Bordeaux and Burgundy mixtures, fungicides used for vineyard treatments. This study aimed to investigate the effect of copper sulphate (from 0 to 8 mM) on radial growth rate and lag time of two moulds responsible for vine grapes spoilage: *Penicillium expansum* strain 25.03 and *Botrytis cinerea*, strains BC1 and BC2. By modelling the effect of copper sulphate on the radial growth rate, the concentrations at which  $\mu = \mu_{opt}/2$ , (Cu50), were in the range of 2.2 to 2.6 mM. *P. expansum* exhibited a linear correlation ( $r = 0.84$ ) between the radial growth rate and the reciprocal of the lag time. In contrast, in the range 0-4 mM, the radial growth rate of *B. cinerea* decreased whereas the lag time was constant. In the range 4-8 mM, the radial growth rate of *B. cinerea* was almost constant (c.a. 1 mm d<sup>-1</sup>) while the lag time was increased. Therefore, the minimum inhibitory concentration, MIC, was not defined as the concentration at which no growth was observed, but as the concentration at which the lag time was infinite. The MIC values, that depended significantly on the moulds, were 4.7 mM for *P. expansum*, 8.2 and 7.3 mM for *B. cinerea* strain BC1 and BC2 respectively.

1 **Modelling the inhibitory effect of copper sulphate on the growth of *Penicillium***  
2 ***expansum* and *Botrytis cinerea***

3

4 Daniela Judet-Correia<sup>1</sup>, Claudine Charpentier<sup>2</sup>, Maurice Bensoussan<sup>3</sup> and Philippe Dantigny<sup>3,\*</sup>

5

6 <sup>1</sup>Laboratoire Eau, Molécules actives, Macromolécules, Activité

7 <sup>2</sup>Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, UMR INRA 1131

8 <sup>3</sup>Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires

9 AgroSup Dijon, Université de Bourgogne, France

10

11 Running title: Inhibition of *P. expansum* and *B. cinerea* by copper

12

13 Keywords: Model, Copper, inhibition, fungi, mould, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, MIC,  
14 predictive mycology.

15

16 \*Corresponding author:

17 Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires,

18 Agro-Sup Dijon, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.

19 Phone: 33 (0)3 80 77 40 71.

20 Fax: 33 (0)3 80 39 66 40.

21 email: phdant@u-bourgogne.fr

22

23 **Abstract**

24

25 Copper is the active component of Bordeaux and Burgundy mixtures, fungicides used for vineyard  
26 treatments. This study aimed to investigate the effect of copper sulphate (from 0 to 8 mM) on radial  
27 growth rate and lag time of two moulds responsible for vine grapes spoilage: *Penicillium expansum*  
28 strain 25.03 and *Botrytis cinerea*, strains BC1 and BC2. By modelling the effect of copper sulphate  
29 on the radial growth rate, the concentrations at which  $\mu = \mu_{opt}/2$ , ( $Cu_{50}$ ), were in the range of 2.2 to  
30 2.6 mM. *P. expansum* exhibited a linear correlation ( $r = 0.84$ ) between the radial growth rate and the  
31 reciprocal of the lag time. In contrast, in the range 0-4 mM, the radial growth rate of *B. cinerea*  
32 decreased whereas the lag time was constant. In the range 4-8 mM, the radial growth rate of *B.*  
33 *cinerea* was almost constant (c.a. 1 mm d<sup>-1</sup>) while the lag time was increased. Therefore, the  
34 minimum inhibitory concentration, MIC, was not defined as the concentration at which no growth  
35 was observed, but as the concentration at which the lag time was infinite. The MIC values, that  
36 depended significantly on the moulds, were 4.7 mM for *P. expansum*, 8.2 and 7.3 mM for *B. cinerea*  
37 strain BC1 and BC2 respectively.

38

39 **1. Introduction**

40

41 Microorganisms are negatively affected by heavy metals present in their environment due to  
42 rapid urbanization and industrialization (Gadd and Griffiths, 1978; Giller et al., 1998). Even though  
43 many of them are essential for growth, in excessive concentrations they are toxic for living cells.  
44 The effects of metals can depend on the species of the fungi and also on different strains (Sabie and  
45 Gadd, 1990). Heavy metals such as cadmium, nickel and zinc showed to be harmful to *Penicillium*  
46 *atramentosum* and *Penicillium funiculosum* at all stages of fungal development (Levinskaitė, 2001).

47 Copper is a toxic metal and also an essential nutrient for living cells as it is the constituent of  
48 many metalloenzymes such as cytochrome-c oxidase (Lontie, 1984; Saitoh et al., 2009). The  
49 influence of copper on microorganisms has been studied in the literature as copper is the active  
50 component of aquatic herbicides (Colby et al., 1989), bactericides (Cooksey, 1990) and fungicides  
51 used in agriculture (Foye, 1977). The Bordeaux mixture contains copper sulphate, lime and water.  
52 Burgundy mixture prepared from copper sulphate and sodium carbonate is analogous to Bordeaux  
53 mixture (Borkow and Gabbay, 2005). These fungicides based on copper are used in vineyards  
54 against *Mildew* and *B. cinerea*. It has been suggested that toxicity is made by electrostatic bonds  
55 between copper ions and negatively charged regions on the microorganisms cell walls which  
56 increases permeability and also reduces uptake of nutrients (Borkow and Gabbay, 2005).

57 The effect of copper on moulds was studied from several points of view: resistance  
58 mechanisms; growth; spore, biomass or metabolites production; morphology. The presence of high  
59 concentrations of cupric ions in the environment may determine moulds to develop special  
60 resistance mechanisms (Cervantes and Gutierrez-Corona, 1994). An increase in the lag time for  
61 growth of *Trichoderma viride* has been reported to be dependent on copper concentration (Anand et  
62 al., 2006). The effect of copper on radial growth rate of wood-rotting fungi and a blue-stain fungus  
63 has been studied. The radial growth rates of these fungi decreased with the increase of the copper

64 concentration (Guillén and Machuca, 2008). Copper ions induced an increase in citric acid  
65 production by *Aspergillus niger* (Haq et al., 2002). *P. expansum* has an increased production of  
66 geosmin in the presence of copper (Dionigi and Champagne, 1995). Amongst the different metals  
67 studied, such as manganese, magnesium, cobalt, nickel, copper and zinc, only copper increased  
68 geosmin, biomass and spore production of *P. expansum* on synthetic media (Dionigi et al., 1996). At  
69 high doses of copper, 100 mg/kg of medium, it was observed that the mycelium of *Acremonium*  
70 *pinkertoniae* acquired a characteristic blue colour, in addition to the formation of crystalloid  
71 structures within thickened cell walls (Zapotoczny et al., 2007).

72 *B. cinerea* and *P. expansum* are fungi which commonly infect grape berries (Laforgue et al.,  
73 2009). Bordeaux and Burgundy mixtures are necessary to prevent from the growth of these moulds  
74 in vineyards. However, due to regular treatments with these fungicides, it is well-known that copper  
75 accumulates in the soils up to 250 mg/kg (Pietrzak and McPhail, 2004). In order to ensure the  
76 sustainability of vineyards, it is necessary to limit the quantities of copper applied to these cultures.  
77 Little information is available on the effect of copper sulphate on radial growth rate and lag time of  
78 these two grape rot fungi. The aim of this study was to assess the influence of copper sulphate on  
79 radial growth rate and lag time of one strain of *P. expansum* and two strains of *B. cinerea*. The  
80 minimum inhibitory concentration, MIC, for copper sulphate, was determined for these fungi by  
81 means of predictive models.

82

## 83 **2. Materials and methods**

84

### 85 **2.1. Fungal isolates**

86

87 *Penicillium expansum* (strain 25.03) and *Botrytis cinerea* (strain BC1 and BC2) were  
88 isolated from cv. Pinot grapes in September 2007 (Burgundy, France) and identified according to

89 the descriptions of Samson et al. (2004). Moulds were maintained on Potato Dextrose Agar medium  
90 (PDA; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) at room temperature, from 17 to 25°C.

91

## 92 2.2. Spore preparation

93

94 Fungi were inoculated on PDA medium and incubated at 25°C for 7 days. Sporulating  
95 cultures were flood with 4.5 ml of a saline solution (NaCl, 9 g.l<sup>-1</sup>) that contained Tween 80 (0.1 %  
96 vol/vol). Suspension counts were determined by a Malassez cell and standardised to 10<sup>6</sup> spores ml<sup>-1</sup>.  
97 10 µl of the spore suspensions were used to inoculate the centre of the dishes.

98

## 99 2.3. Medium

100

101 The PDA medium, pH 5.7, 0.99 a<sub>w</sub>, was used for assessing the influence of copper sulphate  
102 on radial growth rate and lag time. Copper sulphate was added to PDA medium as a solid salt  
103 (CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O) to final concentrations from 0 (control cultures) to 8 mM of copper (II) ions with a  
104 1 mM increment. The incubation temperature was 25°C.

105

## 106 2.4. Growth measurements

107

108 Growth was evaluated daily by measurement of the diameter of the fungal colony along two  
109 perpendicular diameters (Gervais et al., 1988). The mean radius was plotted against time and radial  
110 growth rates,  $\mu$ , (mm day<sup>-1</sup>) were evaluated from the slopes by linear regression. The lag time,  $\lambda$  (h),  
111 was determined from the intercept of the straight line with the initial radius of the inoculated droplet  
112 (ca 4.5 mm). All experiments were carried out in triplicate at least for a maximum period of 8  
113 weeks. Prior to fitting, a square-root (Dantigny and Bensoussan, 2008) and a logarithmic

114 (Zwietering et al., 1994) transformations were used to stabilise the variance of  $\mu$  and  $\lambda$ , respectively.

115

## 116 2.5. Secondary models

117

118 The influence of copper sulphate on the radial growth rate was assessed by the following  
119 (Yano and Koga, 1973):

$$120 \quad \sqrt{\mu} = \sqrt{\frac{\mu_{opt}}{1 + \left(\frac{Cu}{Cu_{50}}\right)^p}} \quad (1)$$

121 where  $\mu_{opt}$  (mm d<sup>-1</sup>) is the radial growth rate at Cu = 0 mM; Cu<sub>50</sub> (mM) is the copper sulphate  
122 concentration at which  $\mu = \mu_{opt}/2$  and p, a design parameter. The influence of copper sulphate on lag  
123 time was determined by the reciprocal of a re-parameterized Monod-type equation (Dantigny et al.,  
124 2005a):

125

$$126 \quad \ln(\lambda) = \ln\left(\lambda_{opt} \frac{Cu_{200} \cdot MIC - 2Cu_{200} \cdot Cu + Cu \cdot MIC}{Cu_{200} \cdot (MIC - Cu)}\right) \quad (2)$$

127

128 where  $\lambda_{opt}$  (h) is the lag time at Cu = 0 mM; Cu<sub>200</sub> (mM) is the copper sulphate concentration at  
129 which  $\lambda = 2\lambda_{opt}$  and MIC (mM) is the minimum inhibitory concentration of copper sulphate at which  
130 the lag time is infinite. All model equations were fitted to the data using nonlinear regression  
131 software (SlideWrite 5.1, Advanced Graphics Software, Carlsbad, CA) based upon the Levenberg-  
132 Marquardt algorithm as described previously (Dantigny, 1998).

133

## 134 3. Results

135

136 The optimum radial growth rate of *P. expansum* strain 25.03 was equal to 2 mm d<sup>-1</sup> (Table 1)  
137 and characterized by a narrow confidence interval (ca. 10 % error). At Cu<sub>50</sub> = 2.41 mM, the radial  
138 growth rate was equal to half the optimum growth rate, 1 mm d<sup>-1</sup>. The design parameter was  
139 significantly greater than 1. The low RMSE value showed the suitability of the model for describing  
140 the effect of copper sulphate on the radial growth rate of *P. expansum* 25.03.

141 At 0 mM copper *B. cinerea* strains BC1 and BC2 exhibited  $\mu_{\text{opt}}$  values equal to 15.9 and  
142 14.3 mm d<sup>-1</sup> respectively, Table 1. The confidence intervals overlapped, therefore the  $\mu_{\text{opt}}$  values of  
143 the strains BC1 and BC2 did not differ significantly. The model provided a good estimation of this  
144 parameter, (less than 10 % and 7 % error for BC1 and BC2 respectively). The p values were 3.04  
145 and 3.59 respectively.

146 The optimum radial growth rates of *B. cinerea* strains BC1 and BC2 were greater than that  
147 for *P. expansum* 25.03. But, the Cu<sub>50</sub> values were no significantly different between the studied  
148 strains (ca. 2.4 mM). The Cu<sub>50</sub> did not depend on the radial growth rate. *B. cinerea* strains were  
149 characterized by smaller p values than *P. expansum* although the differences were not significant.  
150 Model proved less accurate for *B. cinerea* than for *P. expansum* (Table 1).

151 *P. expansum* strain 25.03 was characterized by  $\lambda_{\text{opt}}$  equal to 13.6 h at 0 mM of copper, Table  
152 2. The Cu<sub>200</sub> value was less than the Cu<sub>50</sub> estimated. Accordingly, at 0.8 mM the lag time was twice  
153 that at 0 mM copper, whereas the effect of copper sulphate on the growth rate was not detectable  
154 (Figure 1). At 4.65 mM the estimation of the lag time of *P. expansum* strain 25.03 was infinite,  
155 therefore no growth could occurred. Accordingly this value was defined as the minimum inhibitory  
156 concentration.

157 The optimum lag time estimated for *B. cinerea*, strains BC1 and BC1 was about 30 h. The  
158 Cu<sub>200</sub> values, 3.31 and 3.42 mM for BC1 and BC2, respectively, were not significantly different.  
159 These values were greater than the respective Cu<sub>50</sub> values, although not significant. The MIC value



160 for *B. cinerea* was greater than the MIC value for *P. expansum*. In addition, the MIC value for the  
161 strain BC1 was less than that estimated for the strain BC2 (Table 2).

162 *B. cinerea* strains exhibited  $\lambda_{opt}$  values greater than that of *P. expansum*. However, the  
163 confidence intervals for  $\lambda_{opt}$  did overlap between *P. expansum* and *B. cinerea* strain BC1 due to a  
164 wide confidence interval for the latter strain (Table 2). The estimated  $Cu_{200}$  values were greater for  
165 *B. cinerea* strains BC1 and BC2 than for *P. expansum*. The estimated MIC values were also greater  
166 for *B. cinerea* than for *P. expansum* thus suggesting that the latter fungus was more sensitive to  
167 copper sulphate than *B. cinerea*.

168 The model was fit to the experimental data for *P. expansum* 25.03, Figure 1. A correlation ( $r$   
169 = 0.84) was observed between the radial growth rate and the reciprocal of the lag time. In contrast,  
170 for *B. cinerea* strains BC1 and BC2, in the range 0-4 mM, the radial growth rate decreased whereas  
171 the lag time was constant. Beyond 4 mM of copper until their respective MIC concentrations, the  
172 radial growth rate was constant whereas the lag time was increased (Figure 2 and Figure 3).

173

#### 174 4. Discussion

175

176 The optimum growth rates,  $\mu_{opt}$ , were determined at 0mM copper. The copper sulphate  
177 concentrations at which the growth rate was equal to  $\mu_{opt}/2$ ,  $Cu_{50}$  were estimated by the growth  
178 inhibition model. The copper concentration inhibiting the growth of *Acremonium pinkertoniae* by  
179 50 %,  $Cu_{50} = 250$  mg/kg, 3.9 mM (Zapotoczny et al., 2007) was greater than the  $Cu_{50}$  values  
180 reported in the present study for *P. expansum* and *B. cinerea* (ca 2 mM). Usually the decrease of the  
181 growth rate with increasing the concentration of the inhibitor can be represented by a model  
182 exhibiting an upward or a downward concave shape (Dantigny et al., 2005b). In such a case the  
183 minimum inhibitory concentration, MIC, can be determined as the concentration of the inhibitor at

184 which no growth occurs. In contrast S-shape curves exhibiting an inflection point were observed for  
185 the influence of copper sulphate on the radial growth rate of *B. cinerea*. Accordingly, a new model  
186 equation was developed to fit the experimental data. However, the MIC, could not be determined by  
187 this model, because the growth rate was almost constant for copper sulphate in the range 4-7mM or  
188 4-8mM for the strains BC1 and BC2 respectively.

189 Because an infinite lag time results in an absence of growth, the MIC was defined as the  
190 copper sulphate concentration at which the lag time for growth was infinite. A second model was  
191 therefore developed to fit the lag time as a function of copper sulphate concentration and to estimate  
192 the MIC. Copper tolerant fungi were defined as being capable of growth at approximately 100  
193 mg/kg, 1.6 mM (Wainwright and Gadd, 1997). Among different fungi isolated from metal  
194 contaminated agricultural soils, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. and *Geotrichum* sp.,  
195 showed low resistance to copper (MIC = 0.01-0.06 mM). *Penicillium* sp. and *Rhizopus* sp. exhibited  
196 higher copper resistance (MIC = 0.13 and 0.14 mM respectively) (Zafar et al., 2007). The MIC  
197 values reported in this study for *B. cinerea* 7.28 and 8.22 mM and *P. expansum*, 4.65 mM, were in  
198 the same range as values determined for white-rot and blue-stain fungi, 3 and 6 mM respectively,  
199 and brown-rot fungi, 10 mM (Guillén and Machuca, 2008).

200 The moulds examined in this study showed a great tolerance at high copper concentrations  
201 added in the PDA medium. However, comparisons of our data with MIC values from the literature  
202 are difficult because the methods and the experimental conditions may be different. Other factors  
203 should be taken into account when determining the MIC value and comparing results. The MIC  
204 determined on solid media may not be the same on liquid media; agar can affect metal solubility  
205 (Hartley et al., 1997). pH affects the availability of the metal. At acid pH metals exist as free ionic  
206 cations, but at alkaline pH, cations precipitate as insoluble oxides or hydroxides. Compounds such  
207 as citrate, cysteine, glutamate or EDTA, are able to chelate metals when added to the media and  
208 though decrease toxicity (Gadd and Griffiths, 1978). In the present study, the maximum incubation

209 time was equal to 6 weeks. A shorter incubation time, 2-5 days, was used to allow growth (Zafar et  
210 al., 2007). The incubation time is an important factor that influences the MIC value. It is clear that  
211 the behaviour of *B. cinerea* at high copper concentrations could not have been exhibited for short  
212 incubation times.

213 Cervantes and Gutierrez-Corona (1994), described copper resistance mechanisms in fungi  
214 such as copper binding in fungal cells, copper uptake or intra- and extracellular chelation of copper.  
215 The tolerance of the species to copper should be assessed both in the ability to germinate and  
216 hyphal extension after germination (Phelan et al., 1990). These biological responses can be  
217 evaluated from the lag time for growth, because germination occurred during that time, and from  
218 the growth rate respectively. The radial growth rate and the lag time are though important indicators  
219 of metal tolerance.

220 *P. expansum* exhibited an increase in the lag time for growth with increasing copper  
221 concentration. This indicated that germination was affected by copper. The growth of the germ  
222 tubes was affected by heavy metals thus the rate of germination. Copper may bind on the surface of  
223 the spores during germination so some time is necessary for a detoxification process and a selection  
224 of surviving spores. This mechanism was clearly explained for *Trichoderma viride* for which 79 %  
225 of the copper was found in the cell wall fraction. Copper got accumulated on the cell surface during  
226 the lag phase for growth when germination took place so that the fungus could resume its normal  
227 growth (Anand et al., 2006). Fungal cells, at lag phase (i.e., germination) or early stages of growth  
228 have a higher biosorptive capacity for metal ions than that of stationary phase (Kapoor and  
229 Viraghavan, 1997). The immobilisation of the metal on the surface of the cells reduced its  
230 availability and toxicity.

231 The cell wall composition and the chitin content have an important role in tolerance  
232 mechanisms in fungi. At 3.2 mM CuSO<sub>4</sub>, the copper resistant strains of *Mucor rouxii* bounded about  
233 15 % more copper in the cell walls than in the cytosol and membranes (Ramirez-Salgado et al.,

234 1996). The surface binding was rapid and accounted for 30-40% of the total cobalt uptake for  
235 *Neurospora crassa* (Venkateswerlu and Sastry, 1970). The blue cell walls of *Acremonium*  
236 *pinkertoniae* contained ca. 11 % of copper ions whereas the chitin content was estimated to be 16 %  
237 (Zapoczny et al., 2007). The accumulation of copper was temperature and pH dependent. The  
238 optimal pH value for biosorption of copper is 5-9 (Voleski, 1990). Zinc uptake in *Neocosmopora*  
239 *vasinfecta* was made in two phases, the first one represented adsorption to negatively charged  
240 groups in the hyphal surface-membrane, whereas in the second phase the metal was deposited in the  
241 cytoplasm and nucleus (Paton and Budd, 1972).

242         The lag time for growth of *B. cinerea* was not affected by copper concentrations from 0 to 4  
243 mM. It is suggested that, in contrast to growth, the germination did not depend on these copper  
244 concentrations. At greater concentrations, above 4 mM, copper delayed germination of *B. cinerea*  
245 spores. More time was required for detoxification of the medium by binding copper at the surface of  
246 some spores, thus preventing them from germination. However, it is suggested that this mechanism  
247 allow the other spores to germinate once the medium is sufficiently detoxified. This hypothesis is  
248 supported by the observed decrease in the viable spores at increased metal concentrations.  
249 Leviskaitė (2001) showed that only 20 % and 6 % of the spores of *P. atramentosum* were able to  
250 germinate at 5 mM of cadmium and nickel respectively. Further investigations are necessary to  
251 study the influence of copper on the percentage of viable spores and the influence of the number of  
252 spores inoculated on the lag time for growth. Although speculative for the species herein studied,  
253 the mechanisms as above described could explain the extension of the lag time and the growth  
254 inhibition by copper reported in the present study.

255

## 256 **5. Conclusions**

257

258         The grape-rot fungi studied here are resistant to copper-based fungicides. Copper

259 concentrations greater than 4 mM inhibited growth of *P. expansum* and delayed germination of *B.*  
260 *cinerea*. This concentration would be sufficient to control the development of these species. The  
261 MIC determined in this study was the result of a toxicity measured in laboratory. It would be  
262 interesting to compare this value to copper concentrations on grapes after vineyard treatment with  
263 the “Bordeaux mixture”.

264

265

## 266 **Acknowledgements**

267

268 This work was supported by the National Program on earthy/musty taste of wine  
269 (AGRIMER, Paris, France) project N° 01 04 21 08 0004 21.

270

271

272

273

274

275

276

277

278 **References**

279

280 Anand, P., Isar, J., Saran, S., Saxena, R. K., 2006. Bioaccumulation of copper by *Trichoderma*  
281 *viride*. *Bioresource Technology*, 97, 1018-1025.

282

283 Borkow, G., Gabbay, J., 2005. Copper as a biocidal tool. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 2163-  
284 2175.

285

286 Cervantes, C., Gutierrez-Corona, F., 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi.  
287 *FEMS Microbiology*, 14, 121-138.

288

289 Colby, S. R., Hill, E. R., Kitchen, L. M., Lym, R. G., McAvoy, W. G., Prasad, R., 1989. Herbicide  
290 Handbook of the Weed Science Society of America. Weed Science Society of America.  
291 Champaign, IL.

292

293 Cooksey, D. A., 1990. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Annual Review*  
294 *of Phytopathology*, 28, 201-219.

295

296 Dantigny, P., 1998. Dimensionless analysis of the microbial growth rate dependence on sub-optimal  
297 temperatures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21, 215-218.

298

299 Dantigny, P., Tchobanov, I., Bensoussan, M., Zwietering, M., 2005a. Modelling the effect of ethanol  
300 vapor on the germination time of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Food Protection*, 68,  
301 1203-1207.

302

303 Dantigny, P., Guilmart, A., Radoi, F., Bensoussan, M., Zwietering, M., 2005b. Modelling the effect  
304 of ethanol on growth rate of food spoilage moulds. *International Journal of Food*  
305 *Microbiology*, 98, 261-269.

306

307 Dantigny, P., Bensoussan, M., 2008. The logarithmic transformation should be avoided for  
308 stabilising the variance of mould growth rate. *International Journal of Food Microbiology*,  
309 121, 225-228.

310

311 Dionigi, C. P., Champagne, E. T., 1995. Copper-containing aquatic herbicides increase geosmin  
312 biosynthesis by *Streptomyces tendae* and *Penicillium expansum*. *Weed science*, 43, 196-200.

313

314 Dionigi, C. P., Ahten, T. S., Wartelle, L. H., 1996. Effects of several metals on spore, biomass, and  
315 geosmin production by *Streptomyces tendae* and *Penicillium expansum*. *Journal of Industrial*  
316 *Microbiology*, 17, 84-88.

317

318 Foye, W. O., 1977. Antimicrobial activities of mineral elements. In: *Microorganisms and minerals*,  
319 Weinberg, E.D., Ed., pp 387-419. Marcel Decker, New York.

320

321 Gadd, G. M., Griffiths, A. J., 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecology*,  
322 317, 303-317.

323

324 Gervais, P., Fasquel, J-P., Molin, P., 1988. Water relations of spore germination. *Applied*

325 *Microbiology and Biotechnology*, 29, 586-592.

326

327 Giller, K. E., Witter, E., McGrath, S. P., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and  
328 microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 1389-  
329 1414.

330

331 Guillén, Y., Machuca, Á., 2008. The effect of copper on the growth of wood-rotting fungi and a  
332 blue-stain fungus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 31-37.

333

334 Hartley, J., Cairney, J.W.G., Meharg, A.A., 1997. Do ectomycorrhizal fungi exhibit adaptive  
335 tolerance to potentially toxic metals in the environment? *Plant Soil*, 189, 303–319.

336

337 Haq, I., Ali, S., Qadeer, M., Iqbal, J., 2002. Effect of copper ions on mould morphology and citric  
338 acid productivity by *Aspergillus niger* using molasses based media. *Process Biochemistry*, 37,  
339 1085-1090.

340

341 Kapoor, A., Viraraghavan, T., 1997, Fungi as biosorption. In: Wase, D.A.J., Forster, C.F. (eds)  
342 Biosorbents for metal ions. Taylor and Francis, London, UK, pp 67-85.

343

344 Laforgue, R., Guérin, L., Pernelle, J. J., Monnet, C., Dupont, J., Bouix, M., 2009. Evaluation of  
345 PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. *Journal of Applied*  
346 *Microbiology*, 107, 1208-1218.

347



348 Levinskaitė, L., 2001. Effect of heavy metals on the individual development of two fungi from the  
349 genus *Penicillium*. *Biologija*, 1, 25-29.

350

351 Lontie, R., 1984. Copper proteins and copper enzymes, CRC Press, Boca Raton, FL.

352

353 Paton, W. H. N., Budd, K., 1972. Zinc uptake in *Neocosmopora vasinfecta*. *Journal of General*  
354 *Microbiology*, 72, 173-184.

355

356 Phelan, A., Thurman, D. A., Tomsett, A. B., 1990. The isolation and characterization of copper-  
357 resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Current Microbiology*, 21, 255-260.

358

359 Pietrzak, U., McPhail, D.C., 2004. Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard  
360 soils of Victoria, Australia. *Geoderma*, 122, 151-166.

361

362 Ramirez-Salgado, P., Caracheo-Aguilar, S., Obregon-Herrera, A., Sosa-Luna, L., Amezquita-Lopez,  
363 F., Mendoza-Diaz, G., Gutiérrez-Corona, F., 1996. Copper resistance and accumulation in the  
364 zygomycete *Mucor rouxii*. *Current Microbiology*, 33, 163-166.

365

366 Sabie, F. T., Gadd G. M., 1990. Effect of zinc on the yeast-mycelium transition of *Candida albicans*  
367 and examination of zinc uptake at different stages of growth. *Mycological Research*, 94, 952-  
368 958.

369

370 Saitoh, Y., Izumitsu, K., Tanaka, C., 2009. Phylogenetic analysis of heavy-metal ATPases in fungi  
371 and characterization of the copper-transporting ATPase of *Cochliobolus heterostrophus*.  
372 *Mycological Research*, 113, 737-745.

373

374 Venkateswerlu, G., Sastry, K. S., 1970. The Mechanism of Uptake of Cobalt Ions by *Neurospora*  
375 *crassa*. *Biochemical Journal*, 118, 497-503.

376

377 Voleski, B., 1990. Biosorption by fungal biomass. In: Volesky, B. (ed). Biosorption of heavy metals.  
378 CRC Press, Boca Raton, Fl, pp 140-171.

379

380 Wainwright, M., Gadd, G.M, 1997. Fungi and industrial pollutants, In: Wicklow, D.T., Söderström,  
381 B., Editors, The Mycota IV, Environmental and Microbial.

382

383 Yano, T., Koga, S., 1973. Dynamic behaviour of the chemostat subject to product inhibition. *The*  
384 *Journal of General and Applied Microbiology*, 19, 97-114.

385

386 Zafar, S., Aqil, F., Ahmad, I., 2007. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi  
387 isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource Technology*, 98, 2557-2561.

388

389 Zapotoczny, S., Jurkiewicz, A., Tylko, G., Anielska, T., Turnau, K., 2007. Accumulation of copper  
390 by *Acremonium pinkertoniae*, a fungus isolated from industrial wastes. *Microbiological*  
391 *Research*, 162, 219-228.

392

393 Zwietering, M. H., Cuppers, H. G. A. M., de Wit, J. C., van't Riet, K., 1994. Evaluation of data  
394 transformation and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth.  
395 *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 195-203.  
396

397 **Table 1.** Parameter estimates and RMSE values for modelling the influence of copper on growth, 95  
 398 % confidence intervals in brackets  
 399

Mould	$\mu_{opt}$ (mm day <sup>-1</sup> )	Cu <sub>50</sub> (mM)	p (-)	RMSE
<i>Penicillium expansum</i> 25.03	1.99 [1.79; 2.19]	2.41 [2.19; 2.63]	4.43 [3.39; 5.48]	0.070
<i>Botrytis cinerea</i> BC1	15.9 [14.4; 17.4]	2.21 [1.92; 2.50]	3.04 [2.50; 3.59]	0.254
<i>Botrytis cinerea</i> BC2	14.3 [13.3; 15.2]	2.60 [2.39; 2.82]	3.59 [3.09; 4.11]	0.181

400  
 401  
 402  
 403  
 404  
 405  
 406  
 407  
 408  
 409  
 410  
 411  
 412  
 413  
 414  
 415  
 416  
 417  
 418  
 419  
 420  
 421  
 422  
 423  
 424  
 425  
 426  
 427  
 428  
 429  
 430  
 431  
 432  
 433  
 434  
 435  
 436  
 437  
 438

Cu<sub>50</sub> : Copper concentration at which  $\mu = \mu_{opt}/2$ , p : design parameter

439  
440  
441  
442

**Table 2.** Parameter estimates and RMSE values for modelling the influence of copper on lag time, 95 % confidence intervals in brackets

Mould	$\lambda_{opt}$ (h)	$Cu_{200}$ (mM)	MIC (mM)	RMSE
<i>Penicillium expansum</i> 25.03	13.6 [8.59; 18.7]	0.809 [0.422; 1.19]	4.65 [4.26; 5.05]	0.244
<i>Botrytis cinerea</i> BC1	29.6 [17.9; 41.3]	3.31 [1.84; 4.79]	8.22 [7.99; 8.44]	0.532
<i>Botrytis cinerea</i> BC2	32.0 [26.1; 37.9]	3.42 [2.67; 4.17]	7.28 [7.14; 7.42]	0.257

452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486

$Cu_{200}$  =: Copper concentration at which  $\lambda = 2 \lambda_{opt}$ , MIC : Minimum inhibitory concentration

487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519

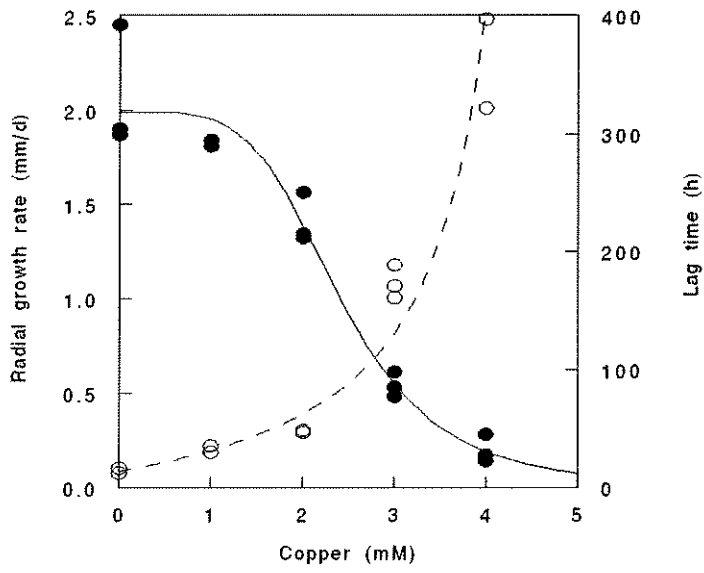
**Figure captions:**

Figure 1: Effect of copper on radial growth rate (○) and lag time (●) of *Penicillium expansum* strain 25.03

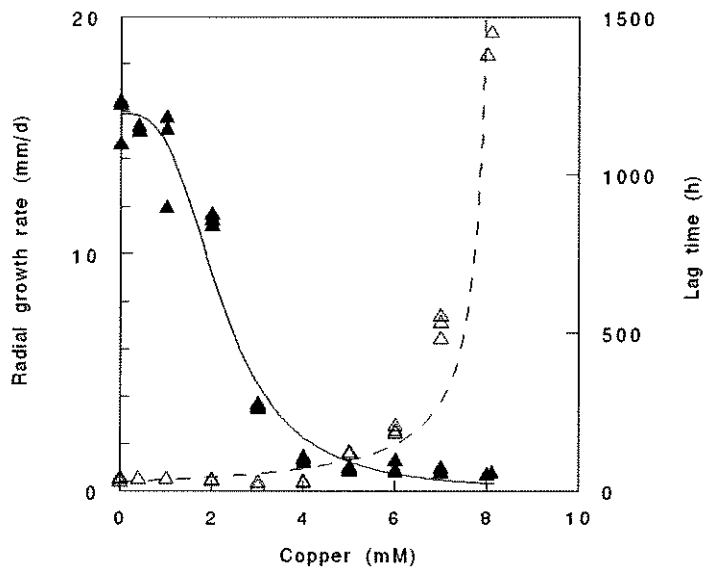
Figure 2: Effect of copper on radial growth rate (△) and lag time (▲) of *Botrytis cinerea* strain BC1

Figure 3: Effect of copper on radial growth rate (▽) and lag time (▼) of *Botrytis cinerea* strain BC2

520  
521  
522  
523

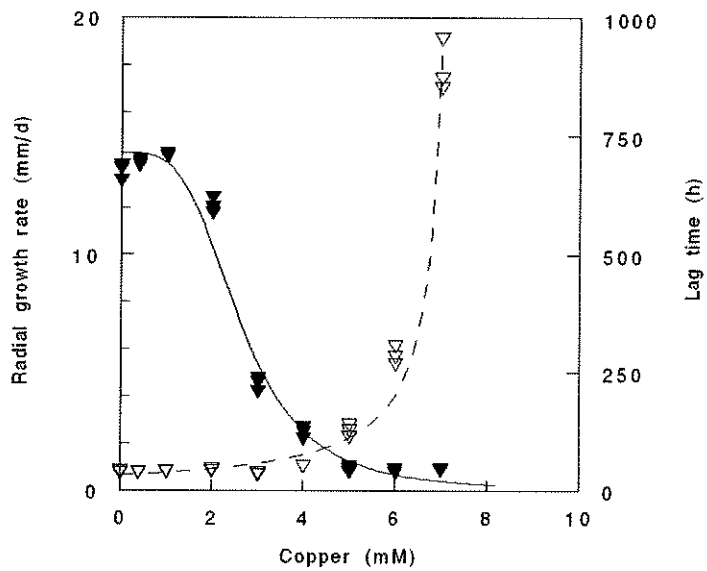


524  
525  
526  
527  
528 Fig. 1



529  
 530  
 531  
 532 Fig. 2  
 533  
 534





536  
537  
538 Fig. 3

### 3. III. 2. CONCLUSIONS

Pour les moisissures étudiées, le  $Cu_{50}$  varie entre 2,2 et 2,6 mM. Pour *P. expansum* on a observé une corrélation linéaire entre le taux de croissance et l'inverse du temps de latence. Pour *B. cinerea*, entre 0 et 4 mM, le taux de croissance diminue et le temps de latence reste constant. tandis que au dessus de 4 mM, le taux de croissance reste constant et le temps de latence augmente. On déduit donc que le cuivre influence la germination et la croissance de *P. expansum*. En revanche, entre 0 et 4 mM, seulement la croissance est influencée par le cuivre, tandis que, de 4 mM à 8 mM, c'est la germination qui subit les effets du cuivre.

Les moisissures étudiées ont montré une certaine résistance au cuivre, les valeurs MIC obtenues ont été égales à 4,7 mM pour *P. expansum*, 8,2 et 7,3 mM respectivement pour *B. cinerea*, souche BC1 et BC2. La détermination de la concentration minimale inhibitrice (MIC) permet de voir dans quelle mesure la « Bouillie Bordelaise » agit efficacement sur le développement fongique, tout en sachant que les champignons peuvent développer une résistance au cuivre.

### **3. IV. EFFETS COMBINES DE LA TEMPERATURE, DU DIOXYDE DE CARBONE ET DU CUIVRE SUR LA PRODUCTION DE GEOSMINE PAR *PENICILLIUM EXPANSUM***

#### **3. IV. 1. Présentation**

Ce travail consiste à tester les effets de facteurs environnementaux et nutritionnels et d'approcher les conditions qui limitent la production de géosmine par *P. expansum*. L'approche expérimentale choisie a été la matrice de Doehlert, car elle fournit un maximum d'informations en un minimum d'expériences. On a la possibilité d'étudier l'influence des facteurs ainsi que leurs interactions, tout en ayant plusieurs niveaux pour chacun des facteurs.

*P. expansum* a été cultivé sur milieu Czapek Agar, en faisant varier les différents facteurs d'après la matrice de Doehlert. Une gamme allant de 10 à 30°C a été testée, afin de couvrir les températures pouvant être rencontrées en période estivale (jour et nuit).

Au cours de la maturation, pendant la véraison, le pourcentage de CO<sub>2</sub> augmente dans l'ambiance en raison de l'utilisation du malate pour la respiration. Comparativement au glucose et à l'amidon, le malate libère plus de CO<sub>2</sub> par unité d'O<sub>2</sub> consommée. Cela nous a amené à tester le CO<sub>2</sub>, de la teneur ambiante (0,03 %) jusqu'à 100 fois plus (3,03 %), avec une valeur intermédiaire (1,53 %).

Le troisième facteur testé est le cuivre (sous forme de sulfate). Il intervient dans la production viticole en particulier sous la forme du fongicide appelé « Bouillie Bordelaise ». A partir d'une concentration de 12,75 mg/L expérimentée précédemment, nous avons déterminé les niveaux en calculant des multiples de cette valeur entre 0 et 76,50 mg/L.

1 **Combined effects of temperature, copper and CO<sub>2</sub> on geosmin production**  
2 **by *Penicillium expansum***

3

4 Daniela Judet<sup>1</sup>, Maurice Bensoussan<sup>2</sup>, Claudine Charpentier<sup>3</sup> and Philippe Dantigny<sup>4,\*</sup>

5

6 <sup>1</sup> Laboratoire Eau, Molécules Actives, Macromolécules, Activité

7 <sup>2</sup> GTR Mycologie, Sécurité Microbiologique Alimentaire et Environnement

8 <sup>3</sup> Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, UMR INRA 1131

9 <sup>4</sup> Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires,

10 Université de Bourgogne, Dijon, France

11

12 Running title: Geosmin production by *Penicillium expansum*

13

14 Keywords: geosmin, *Penicillium expansum*, copper, temperature, carbon dioxide

15

16

17 \*Corresponding author.

18 Mailing address:

19 Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires,

20 Agro-Sup Dijon, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.

21 Phone: 33 (0)3 80 77 40 71

22

23 **Abstract**

24

25 **Aims:** This study aimed at assessing the influence of temperature, 10-30°C, copper  
26 concentration, 0-76.50 mg l<sup>-1</sup> and CO<sub>2</sub> in the headspace, 0.03-3%, on the production of  
27 geosmin by *Penicillium expansum* according to a Doehlert design.

28

29 **Methods and Results:**

30 In the experimental domain, the factors were ranked by an increasing order of importance,  
31 temperature, CO<sub>2</sub> and copper concentration. Production of geosmin was enhanced at low  
32 temperature, 0.03 % CO<sub>2</sub> (i.e., atmospheric level) and high copper concentration.

33

34 **Conclusions:** Up to 3150 ng l<sup>-1</sup> geosmin were produced on Czapeck agar after 7 days  
35 incubation under atmospheric CO<sub>2</sub> at 20°C and 63.75 mg l<sup>-1</sup> copper.

36

37 **Significance and Impact of the Study:** Low copper concentration on grapes, as a result of  
38 cupric fungicide treatments of vineyards (i.e. bordelaise mixture) may stimulate geosmin  
39 production by *P. expansum*.

40

## 41 **Introduction**

42

43 Grape rot is one of the major causes of degradation of grape compounds, leading to  
44 deterioration of wine quality. Over the past ten years winegrowers in Burgundy have observed  
45 organoleptic defects with earthy/musty odors in musts and wines made with rotten grapes.  
46 The compound responsible for this odor in Bordeaux wines was identified as geosmin by  
47 Darriet *et al.* (2000). The content of geosmin in various Bordeaux wines varied between 20  
48 and 300 ng l<sup>-1</sup>, thus indicating that the concentrations were sometimes clearly higher than the  
49 perception threshold of racemic mixture of geosmin as described in the literature ca. 20ng l<sup>-1</sup>  
50 in water (Maga 1987).

51 *Penicillium expansum* and other species have long been associated with distinctive  
52 odors. Raper and Thom (1949) described the odor of various penicillia as being “strong,  
53 moldy or earthy” (*P. expansum* and *P. crustosum* Thom), “moldy” (*P. claviforme* Bain and *P.*  
54 *olivino-viride* Biourge). Matheis and Roberts (1992) identified geosmin as the primary  
55 component of the odor associated with *P. expansum*. Microbiota on grapes with earthy odor  
56 was analyzed and its potential to produce geosmin on malt agar and grape juice tested.  
57 According to La Guerche *et al.* (2004 and 2006) all the strains producing geosmin belong to  
58 only one *Penicillium* species: *P. expansum*.

59 For various microorganisms, geosmin production was affected by environmental and  
60 nutritional factors. Abiotic factors (temperature, humidity, oxygen concentration) were tested  
61 separately to identify their influence on geosmin production by *P. expansum*. The modification  
62 of these factors affected growth, sporulation and geosmin production of *P. expansum* but did  
63 not have a direct effect on its synthesis (La Guerche *et al.*, 2005). A study of the impact of  
64 grape juice composition) on geosmin production by *P. expansum* (La Guerche *et al.*, 2007)

65 revealed the importance of nitrogen composition: Ammonium played a leading part in  
66 inducing geosmin synthesis but mixed amino acids inhibited geosmin synthesis.

67 Global warming may lead to important variations in rainfalls, temperature and  
68 percentage of carbon dioxide in the atmosphere. An increased accumulation of geosmin in *P.*  
69 *expansum* exposed to 40°C, but no geosmin was produced in the range 10-30°C 48h after  
70 inoculation (Dionigi and Ingram, 1994). An increase in geosmin accumulation was also  
71 reported by these authors when *P. expansum* was incubated at 10% O<sub>2</sub>. But to our knowledge,  
72 the effect of CO<sub>2</sub> on geosmin accumulation in *P. expansum* was never studied. It should be  
73 noted also that CO<sub>2</sub> can be accumulated locally when *P. expansum* is found on the stem.

74 Copper salts through the use of bordelaise mixture (Ca(OH)<sub>2</sub> + Cu SO<sub>4</sub>) are widely  
75 applied as fungicide against mildew of grape vine. An increased growth and geosmin  
76 accumulation in *P. expansum* were observed by exposure to copper (1 and 5 mg l<sup>-1</sup>), through  
77 the addition of copper sulphate to growth media (Dionigi 1995, Dionigi et al. 1996). The  
78 intensive and long-term use of copper has raised concerns regarding the negative effects on  
79 the environment (Beltrami and Capri, 1999; Capri et al., 1999) and wine quality (Gennaro et  
80 al., 1986). Copper concentrations in the top soils exposed to these treatments exhibited  
81 commonly values in the range 100 to up 1500 mg kg<sup>-1</sup> (Brun et al., 2001). For these and other  
82 reasons, the EC N° 1410/2003 has fixed maximum residue levels MRL in grape and wine of  
83 20 mg kg<sup>-1</sup> and 1 mg l<sup>-1</sup>, respectively. But a recent study has shown that 13% of grape  
84 samples and 18% of wine samples exceeded the MRL (García-Esparza et al., 2006).

85 This study aimed at assessing the combined effects of temperature, 10-30°C, copper  
86 concentration, 0-76.50 mg l<sup>-1</sup> and CO<sub>2</sub> in the headspace, 0.03-3%, on the production of  
87 geosmin by *Penicillium expansum* according to a Doehlert design.

88 **Material and Methods**

89

90 **Isolation of microorganisms**

91

92 Microorganisms were isolated from rotten *Vitis vinifera* cvs Pinot noir, collected in Morey-St  
93 Denis vineyards in 2007. Each grape sample was washed with the same weight of saline  
94 (NaCl 9 g l<sup>-1</sup>), containing Tween 80 (0.1% v/v) to remove microorganisms from the berries.  
95 The suspensions were stirred for one hour at ambient temperature (approximately 20°C.  
96 Fractions of 0.1ml of the diluted suspensions (from 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-8</sup>) were spread on Petri dishes  
97 containing Rose Bengal agar medium and incubated at 25°C. After 7 days incubation,  
98 colonies were counted, isolated in pure culture and maintained on Potato Dextrose Agar  
99 (PDA; BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Amongst the isolated strains, *Penicillium*  
100 *expansum* was identified at the laboratory according to macroscopic criteria (Samson et al.,  
101 2004).

102

103 **Media and incubation devices**

104

105 Czapek broth (Difco) solidified by agar (15 g l<sup>-1</sup>) was used as basal medium (Raper and  
106 Thom, 1949). Cultures of *P. expansum* were incubated in the range 10-30°C. The effect of  
107 CO<sub>2</sub> was investigated in incubators with atmospheres containing 0.03, 1.5 and 3.0 % CO<sub>2</sub>.  
108 Supplementation in copper sulfate (CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O) was tested in the range 0-76.5mg l<sup>-1</sup> of  
109 copper. Petri dishes were incubated for 7 days in hermetically closed devices that contained  
110 water to maintain a constant relative humidity throughout the experiments as described  
111 previously (Sautour et al., 2001a).



## 112 **Quantification of geosmin**

113

114 The sporulating mycelium and the agar medium (approximately 15 ml) were removed from  
115 the plate and mixed into 100ml of absolute ethanol solution (20% v/v) with a magnetic stirrer  
116 at 250 rpm 20°C for 1h. After filtering the mixture, a 6 ml aliquot of sample was diluted with  
117 ultra pure water UHQ. According to Dumoulin and Riboulet (2004), geosmin was quantified  
118 at Laboratoire Exact, (Macon, France). Briefly, geosmin (d5) was used as internal standard.  
119 Solutions of geosmin and geosmin (d5) 10  $\mu\text{g. l}^{-1}$  were prepared by dilution with absolute  
120 ethanol. The volatile compounds were extracted by SPME fiber on a polydimethylsiloxane  
121 (PDMS) at 40°C for 30 min. SPME fiber were desorbed for 10 min in the injector of a gas  
122 chromatograph coupled to a mass spectrometer ion trap. The separation of volatile  
123 compounds was conducted on a capillary column VF5-MS (VARIAN). Identification of  
124 geosmin and geosmin (d5) was performed in MS/MS fragmentation ion selective 112 and  
125 114, respectively. Quantification was based on the ions son 97 (geosmin) and 99 (geosmin  
126 (d5)). Limits of detection and quantification of geosmin were 5 and 10  $\text{ng l}^{-1}$ , respectively.

127

## 128 **Experimental matrix**

129

130 An experimental domain was defined over 10-30°C, copper 0.00-63.75  $\text{mg l}^{-1}$  and  $\text{CO}_2$  0.03-  
131 3.0%. The Doehlert design allows the description of a region around an optimal response and  
132 contains  $k^2 + k + 1$  points for k factors. For 3 factors, a set of 13 experiments was required  
133 and, in that case, one of the properties of the Doehlert design is the uniform distribution of the  
134 experiments in a three-dimensional space (Sautour et al., 2001b). Thus, 12 experiments are  
135 equidistant from a central experiment (Experiment 13) having the coded values: (0, 0, 0).  
136 Experimental values are listed in Table 1.

137 **Analysis and interpretation of the results**

138

139 The experimental response, Y, was the concentration of geosmin ng l<sup>-1</sup>. A second-order  
140 polynomial relationship which included quadratic terms was used to determine the optimum  
141 or minimum conditions for geosmin accumulation.

142

143  $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33} X_3^2 + b_{12} X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3$   
144 where X<sub>1</sub> (temperature), X<sub>2</sub> (copper) and X<sub>3</sub> (CO<sub>2</sub>) = coded factors studied.

145

146 Multiple regression analysis based on the least square method was performed by using  
147 Nemrodw software (LPRAI, Marseille, France). The analysis concerned the linear and  
148 quadratic effects of the three factors and their interactions. The significance of the coefficients  
149 was evaluated by multiple regression analysis based upon the F-test with unequal variance,  
150 P<0.05 (\*) and P<0.01 (\*\*).

151

152 **Results**

153

154 The concentrations of geosmin are shown on Table 1. Regardless of temperature and CO<sub>2</sub>  
155 level, high concentrations of geosmin, greater than 1500 ng l<sup>-1</sup>, were obtained at 76.5 mg l<sup>-1</sup>  
156 copper. In contrast, for copper free media, concentrations of geosmin remained less than 100  
157 ng l<sup>-1</sup>. There is a trend in an increase of geosmin production with increasing copper  
158 concentration. The highest geosmin concentration, 3150 ng l<sup>-1</sup>, was exhibited at 63.75 mg l<sup>-1</sup>  
159 copper, 0.03% CO<sub>2</sub> and 20°C. Production of geosmin was stimulated at 0.03% CO<sub>2</sub>. In  
160 contrast, at 3% CO<sub>2</sub>, concentrations of geosmin were less than 15 ng l<sup>-1</sup>. The effect of  
161 temperature on geosmin production was less clear and required a statistical analysis.

162 The model coefficients of the polynomial model were listed on Table 2. The  $b_0$   
163 coefficient represented the concentration of geosmin produced at 20°C, 38.25 mg l<sup>-1</sup> copper  
164 and 1.5% CO<sub>2</sub>, experiment 1. The estimated value by the model,  $b_0=10$  ng l<sup>-1</sup>, was close to the  
165 experimental datum, 5 ng l<sup>-1</sup>. However, compared to the high concentrations detected in other  
166 experiments, 10 ng l<sup>-1</sup> was a low concentration and  $b_0$  was not a significant parameter of the  
167 model. In contrast,  $b_1$  was a significant parameter of the model. The negative value indicated  
168 that greater concentrations of geosmin can be obtained at 10°C than at 30°C. In contrast, the  
169 positive value of  $b_2$  was synonymous for greater concentrations of geosmin at 76.5 mg l<sup>-1</sup>  
170 copper than at 0 mg l<sup>-1</sup>. More geosmin can be produced at 0.03% CO<sub>2</sub> than at 3%, as  
171 suggested by the negative value of  $b_3$ . The significance of the main effects of the factors,  $X_1$   
172 (temperature),  $X_2$  (copper) and  $X_3$  (CO<sub>2</sub>) can be ranked according to the absolute value of the  
173 model coefficients. In the experimental domain,  $|b_1| < |b_3| < |b_2|$ , thus by an increasing order of  
174 importance, the most important factors were temperature, CO<sub>2</sub> and copper.

175 Compared to the quadratic effects of copper and CO<sub>2</sub>, that one of temperature was not  
176 significant as demonstrated by the p-value, 29.3, reported for  $b_{11}$ , Table 2. The interaction  
177 effect between temperature and copper was not significant either as highlighted by the p-  
178 value, 13.8, for  $b_{12}$ . In contrast, significant interaction effects were shown between  
179 temperature and CO<sub>2</sub>,  $b_{13} = 1181.3$ , and between copper and CO<sub>2</sub>,  $b_{23} = -1088.6$ . Both these  
180 effects were synergistic. Assuming the terms  $b_1.X_1$  and  $b_3.X_3$  positives,  $X_1$  and  $X_3$  should  
181 be negatives, due to  $b_1$  and  $b_3$  also negatives. The term  $b_{13}.X_1.X_3$  was positive, such as the  
182 other terms  $b_1.X_1$  and  $b_3.X_3$ , thus increasing the production of geosmin. Similarly, assuming  
183 the terms  $b_2.X_2$  and  $b_3.X_3$  positives,  $X_2$  should be positive and  $X_3$  negative due to  $b_2 > 0$  and  
184  $b_3 < 0$ . The effect of interaction between the factors  $X_2$  (copper) and  $X_3$  (CO<sub>2</sub>) was synergistic  
185 because  $b_{23}.X_2.X_3$  was positive. The polynomial model associated with the surface response

186 methodology can be used also as a predictive model as suggested by a regression coefficient  
187 close to one,  $r^2 = 0.99$ .

188 At 1.5 % CO<sub>2</sub>, the estimated geosmin concentrations were shown as a function of  
189 temperature and copper, Fig. 1. For copper concentrations less than 38.25 mg l<sup>-1</sup> and at  
190 temperatures greater than 20°C, no geosmin can be produced according to the model. In  
191 contrast, at 15°C, 76.5 mg l<sup>-1</sup> copper, the value of geosmin predicted by the model was greater  
192 than 2500 ng l<sup>-1</sup>. This result was in accordance with the experimental value, 2620 ng l<sup>-1</sup>,  
193 obtained for experiment 6, Table 2.

194 At 38.25 mg l<sup>-1</sup> copper, no geosmin can be produced at temperature in the range [20,  
195 30°C] and CO<sub>2</sub> in the range [1.5, 3%]. However, whatever the temperature, at the atmospheric  
196 CO<sub>2</sub> concentration, 0.03%, a significant concentration of geosmin can be produced according  
197 to the model, Fig. 2.

198 At 20°C, no geosmin can be produced at copper concentrations less than 38.25 mg l<sup>-1</sup>  
199 and at CO<sub>2</sub> levels in the range [1.5, 3%], Fig. 3. In the lower right quarter of the graph, a clear  
200 increase of the concentration of geosmin was described with increasing the concentration of  
201 copper. The maximum response curve was set to 2500 ng l<sup>-1</sup> geosmin, but 3150 ng l<sup>-1</sup> was  
202 obtained at 20°C, for 63.75 mg l<sup>-1</sup> copper and 0.03 % CO<sub>2</sub>, experiment 10.

203

## 204 **Discussion**

205

206 In this experimental domain, temperature was significant. It was shown that geosmin  
207 production was enhanced at 10°C. In contrast the biomass produced at 10°C was less than that  
208 produced at 30°C. Therefore, the specific geosmin production was greater at 10°C than at  
209 30°C. Saadoun et al. (2001) analysed the geosmin production by the cyanobacteria *Anabaena*  
210 sp. They noticed that the ratio of the geosmin produced to the biomass was maximum at 15°C

211 whereas the geosmin production by the cyanobacteria greatly decreased above 20°C. Geosmin  
212 production was negatively affected by an increase of CO<sub>2</sub> concentration. Whatever the levels  
213 of copper content and temperature, the geosmin production remained close the limits of  
214 quantification. It was shown that elevated carbon dioxide concentrations decreased the  
215 production of geosmin in *Streptomyces albidoflavus* (Sunesson *et al.*, 1997). The decrease in  
216 the production of secondary metabolites at elevated CO<sub>2</sub> concentration was observed for other  
217 fungi. At 20% CO<sub>2</sub> concentration, a low biomass and penicillin concentrations were reported  
218 by Ho and Smith (1986) thus indicating an inhibition of both primary and secondary  
219 metabolism. To inhibit *P. verrucosum* growth and OTA production by 75% Cairns-Fuller *et*  
220 *al* (2005) showed that at least 50% CO<sub>2</sub> was needed. It is worth keeping in mind that elevated  
221 CO<sub>2</sub> may impact the production of geosmin in combination to other factors such as copper  
222 concentration as suggested by the results of the present study.

223         Up to 3150 ng l<sup>-1</sup> geosmin were produced on Czapeck agar after 7 days incubation at  
224 20°C and 63.75 mg l<sup>-1</sup> copper under atmospheric CO<sub>2</sub>. But, important geosmin concentrations  
225 can also be obtained in less favourable conditions under atmospheric CO<sub>2</sub>. For example, 1939  
226 ng l<sup>-1</sup> at 15°C and 25.50 mg l<sup>-1</sup> copper. It is difficult to correlate the concentrations of geosmin  
227 obtained in this study with the concentrations that can be found in wine. But, due to a very  
228 low perception threshold, earthy/musty odors may be detected in wines for environmental  
229 conditions far from the optimum ones.

230 **Conclusions**

231

232 It is difficult to correlate the concentrations of geosmin obtained in this study with the  
233 concentrations that can be found in wine. But, due to a very low perception threshold,  
234 earthy/musty odors may be detected in wines for environmental conditions far from the  
235 optimum ones. The enhancement of geosmin production in *P. expansum* was demonstrated at  
236 low temperatures, high copper content and atmospheric CO<sub>2</sub> concentration. However, the  
237 concentrations of geosmin found in this study were obtained on Czapek agar. The  
238 concentrations of geosmin produced by *P. expansum* should also be evaluated on grapes and  
239 correlated to the quantities of geosmin detected in wine. The mechanisms that could explain  
240 the role of copper in the enhancement of geosmin production remained unknown. More  
241 studies should be conducted to quantify more accurately the effect of copper on the growth  
242 and on the production of geosmin in *P. expansum* on grapes.

243

244

245 **Acknowledgements**

246 Authors wish to thank the National Program on earthy/musty taste of vine (FRANCE  
247 AGRIMER, Paris)

248

249 **References**

250

251 Baert, K., Devlieghere, F., Flyps, H., Oosterlinck, M., Ahmed, M.M., Rajković, A., Verlinden,  
252 B., Nicolai, B., Debevere, J. and De Meulenaer, B. (2007) Influence of storage conditions of  
253 apples on growth and patulin production by *Penicillium expansum*. *International Journal of*  
254 *Food Microbiology* **119**, 170-181.

255

256 Beltrami, P. and Capri, E. (1999) Alcune riflessioni sulla sostenibilita ambientale dei  
257 trattamenti cuprici in vigneti del Nord Italia. *Informatore Fitopatologico* **4**, 41-43

258

259 Brun, L.A., Maille, J., Hinsinger, P. and Pépin, M. (2001) Evaluation of copper availability to  
260 plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environmental Pollution* **111**, 293-302.

261

262 Cairns-Fuller, V., Aldred, D. and Magan, N. (2005) Water, temperature and gas composition  
263 interactions affect growth and ochratoxin production by isolates of *Penicillium verrucosum*  
264 on wheat grain. *Journal of Applied Microbiology* **96**, 1215-1221.

265

266 Capri, E., Beltrami, P., Boccelli, R.A. and Cattani, I. (1999) Does vineyard cultivation affects  
267 copper accumulation in soils? *In Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Conférence on the*  
268 *Biogeochemistry of Trace Elements*, Vienna, Austria, 11-15.

269

270 Darriet, P., Pons, M., Lamy, S. and Dubourdieu, D. (2000) Identification and quantification of  
271 geosmin, an earthy odorant contaminating wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*  
272 **48**, 4835-4838.

273 Dionigi, C.P. (1995) The effects of copper sulfate on geosmin biosynthesis by *Streptomyces*  
274 *tendae*, *Streptomyces albidoflavus* and *Penicillium expansum*. *Water Science and*  
275 *Technology* **11**, 135-138.

276

277 Dionigi, C.P. and Ingram, D. A. (1994) Effects of temperature and oxygen concentration on  
278 geosmin production by *Streptomyces tendae* and *Penicillium expansum* *J. Agric. Food*  
279 *Chem.*,42, 143–145

280

281 Dionigi, C.P., Ahten, T.S. and Wartelle, L.H. (1996) Effects of several metals on spore,  
282 biomass, and geosmin production by *Streptomyces tendae* and *Penicillium expansum*. *Journal*  
283 *of Industrial Microbiology* **17**, 84-88.

284

285 Dixon, N.M. and Kell, D.B. (1989) The inhibition of CO<sub>2</sub> of the growth and metabolism of  
286 micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology* **67**, 109-136.

287

288 Dumoulin, M. and Riboulet, J.M. (2004) Analyse de géosmine dans les vins: apport de la  
289 microextraction en phase solide (SPME) couplée à l'analyse par GC-MS. *Revue Française*  
290 *d'Oenologie* **208**, 28-30.

291

292 Frisvad, J.C. and Samson, R.A. (2004) Polyphasic taxonomy of the *Penicillium* : a guide to  
293 identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in*  
294 *Mycology* **49**, 1-173.

295

296 García-Esparza, M. A., Capri, E., Pirzadeh, P. and Trevisan, M. (2006) Copper content of  
297 grape and wine from Italian farms. *Food Additives and Contaminants*, **23**, 274-280



298 Gennaro, M.C., Mentasti, E., Sarzanini, C. and Pesticcio, A. (1986) Undesirable and harmful  
299 metals in wines – determination and removal. *Food Chemistry*, **19**, 93-104  
300

301 Harris, J.M., Kriedemann, P.E. and Possingham, J.V. (1971) Grape berry respiration : effect  
302 of metabolic inhibitors . *Vitis* , **9**, 291-298.  
303

304 Ho, C.S. and Smith, M.D. (1986) Effect of dissolved carbon dioxide on penicillin  
305 fermentations: mycelial growth and penicillin production. *Biotechnology and Bioengineering*,  
306 **28**, 668-677  
307

308 La Guerche, S. and De Seneville, L. (2007) Impact of *Botrytis cinerea* strain and metabolism  
309 on (-) geosmin production by *Penicillium expansum* in grape juice. *Antonie Van Leeuwenhoek*  
310 **92**, 331-341.  
311

312 La Guerche, S., Chamont, S., Blancard, D., Dubourdieu, D. and Darriet, P. (2005) Origin of (-  
313 )-geosmin on grapes. On the complementary action of two fungi, *Botrytis cinerea* and  
314 *Penicillium expansum*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **88**, 131-139.  
315

316 La Guerche, S., Dauphin, B., Pons, M., Blancard, D. and Darriet P. (2006) Characterization of  
317 some mushroom and earthy off-odors microbiolliy induced by the development of rot on  
318 grapes *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **54**, 9193-9200  
319

320 La Guerche, S., Garcia, C., Darriet, P., Dubourdieu, D., and Labarère, J. (2004)  
321 Characterization of *Penicillium* species isolated from grape *Current Microbiology* **48**, 405-  
322 411.

323 Li, Y., Wadsö, L. and Larsson, L. (2009) Impact of temperature on growth and metabolic  
324 efficiency of *Penicillium roqueforti* – correlations between produced heat, ergosterol content  
325 and biomass. *Journal of Applied Microbiology* **106**, 1494-1501  
326

327 Maga J.A. ( 1987) Musty/earthy aromas . *Food Reviews International*. **3**, 269-284  
328

329 Mattheis, J.P. and Roberts, R.G. (1992) Identification of geosmin as a volatile metabolite of  
330 *Penicillium expansum*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 3170-3173  
331

332 Raper, K.B. and Thom, C. (1949) A manual of the *Penicillia*. Williams and Wilkins.  
333 Baltimore.  
334

335 Saadoun, I.M., Schrader, K.K. and Blevins, W.T. (2001) Identification of geosmin production  
336 as a volatile métabolite of *Anabaena sp.* *Journal of Basic Microbiology*, **41**, 51-5.  
337

338 Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O. (2004) *Introduction to food*  
339 *and airborne fungi*. 7th edn. Baarn, The Netherlands: Centraalbureau Voor Schimmelcultures.  
340

341 Sautour M., Dantigny, P., C. Divies, C., and Bensoussan. M. (2001a) Temperature-type model for  
342 describing the relationship between fungal growth and water activity. *International Journal of*  
343 *Food Microbiology*, **67**, 63-69.

344 Sautour, M., Rouget, A., Dantigny, P., Divies, C. and Bensoussan, M. (2001b) Application of  
345 Doehlert design to determine the combined effects of temperature, water activity and pH on  
346 conidial germination of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Applied Microbiology*. **91**, 1-7.

347 Schiavo, D., Neira, J.Y. and Nobrega ,J.A. (2008) Direct determination of Cd, Cu and Pb in  
348 wines and grape juices by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry.  
349 *Talanta* **76**, 113-1118.  
350  
351 Sitton, J.W. and Patterson, M.E. (1992) Effect of high carbon dioxide and low oxygen  
352 controlled atmospheres on postharvest decay of apples *Plant disease* **76**, 992-996.  
353  
354 Sunesson, A.-L., Nilsson, C.-A., Carlson, R., Blomquist, G. and Anderson, B. (1997)  
355 Production of volatile metabolites from *Streptomyces albidoflavus* cultivated on gypsum  
356 board and tryptone glucose extract agar – influence of temperature, oxygen and carbon  
357 dioxide levels. *Annals of Occupational Hygiene*, **41**, 393-413  
358

359 **Figure captions**

360

361 **Figure 1** Contour plot of the influence of copper and temperature on the production of  
362 geosmin on Czapek agar by *Penicillium expansum* at 1.5% CO<sub>2</sub>.

363

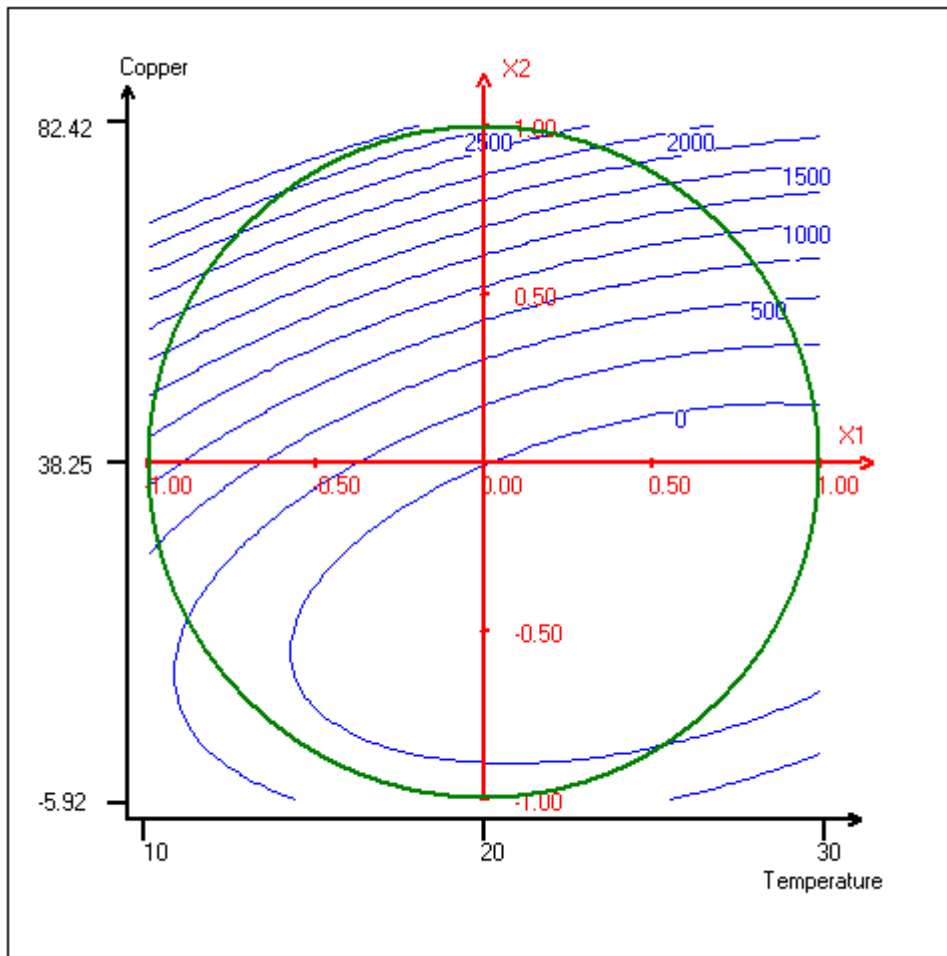
364 **Figure 2** Contour plot of the influence of CO<sub>2</sub> and temperature on the production of geosmin  
365 on Czapek agar by *Penicillium expansum* at 38.25 mg l<sup>-1</sup>.

366

367 **Figure 3** Contour plot of the influence of CO<sub>2</sub> and copper on the production of geosmin on  
368 Czapek agar by *Penicillium expansum* at 20°C.

369

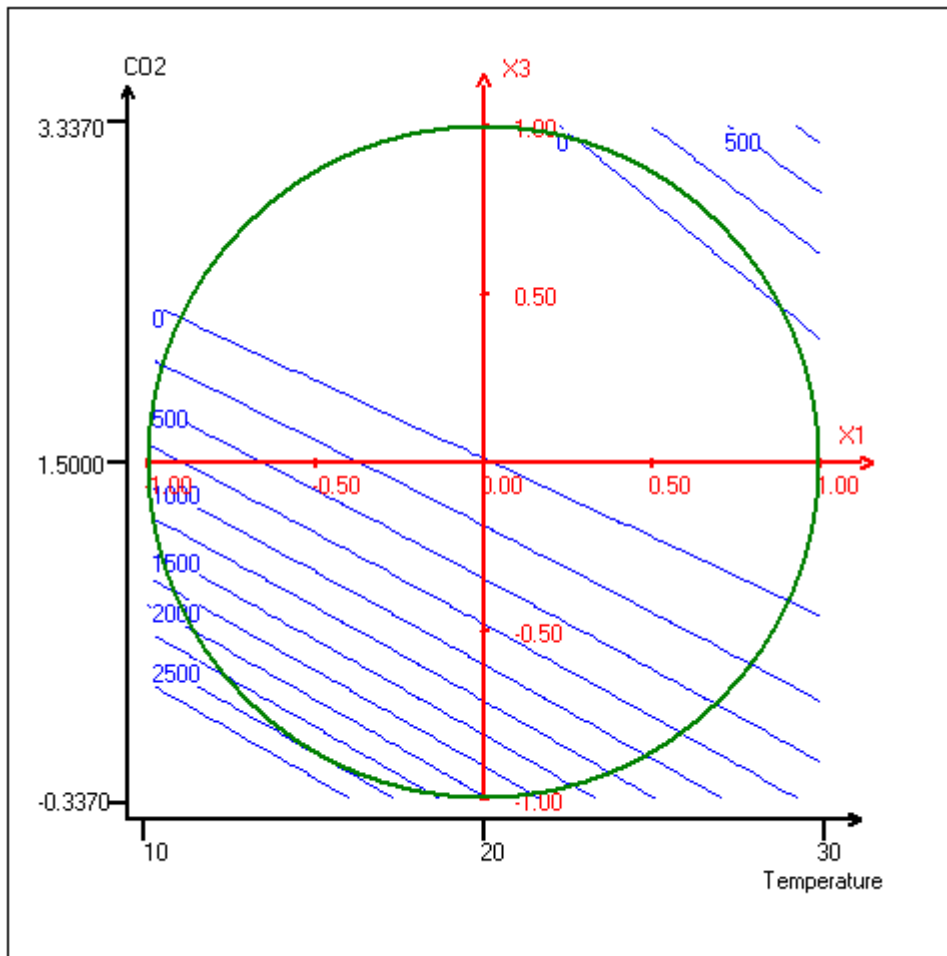
370



371

372

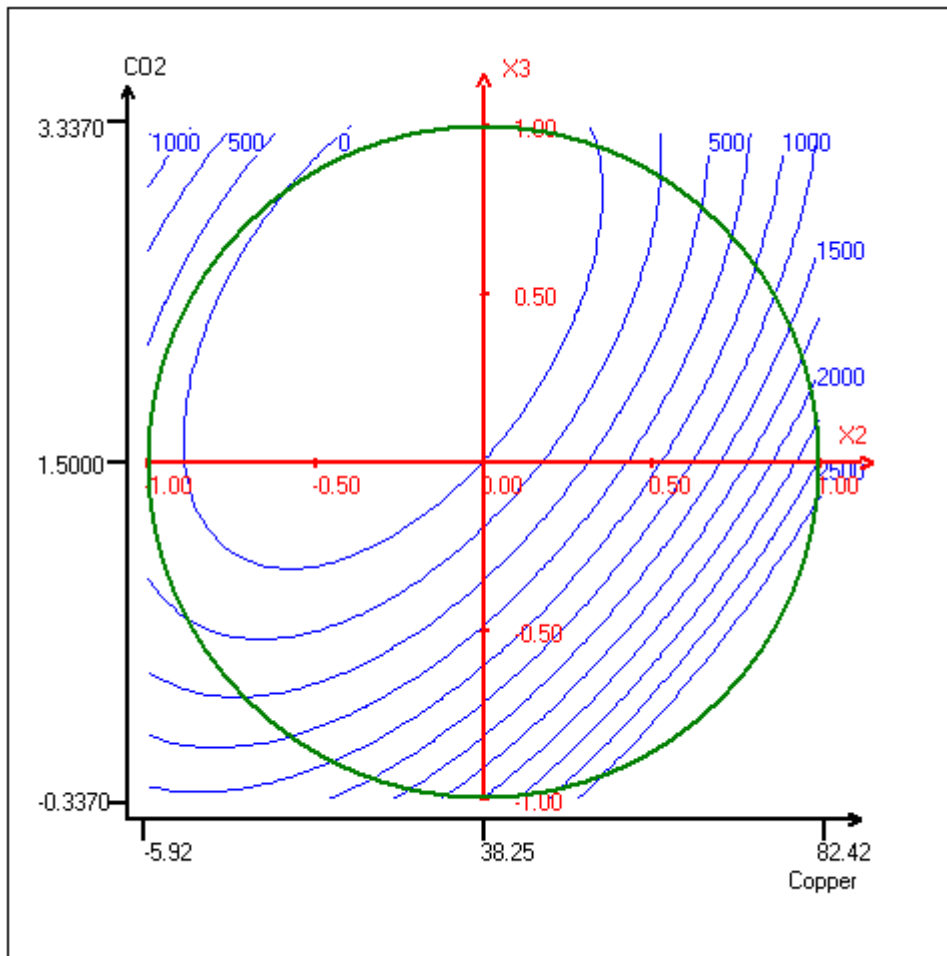
373 Fig. 1



374

375

376 Fig. 2



377

378

379 Fig. 3

380

381 **Table 1** Experimental values for assessing the influence of factors (temperature, copper  
 382 concentration and CO<sub>2</sub>) on the production of geosmin by *Penicillium expansum* on Czapek  
 383 agar.

384

Experiment	Coded values			Experimental values			Response
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Temperature °C	Copper mg l <sup>-1</sup>	CO <sub>2</sub> %	Geosmin ng l <sup>-1</sup>
1	+1	0	0	30	38.25	1.5	5
2	-1	0	0	10	38.25	1.5	710
3	+0.5	+0.866	0	25	76.50	1.5	1659
4	-0.5	-0.866	0	15	0.00	1.5	84
5	+0.5	-0.866	0	25	0.00	1.5	17
6	-0.5	+0.866	0	15	76.50	1.5	2620
7	+0.5	+0.289	+0.816	25	51.00	3.0	5
8	-0.5	-0.289	-0.816	15	25.50	0.03	1939
9	+0.5	-0.289	-0.816	25	25.50	0.03	300
10	0	+0.577	-0.816	20	63.75	0.03	3150
11	-0.5	+0.289	+0.816	15	51.00	3.0	13
12	0	-0.577	+0.816	20	12.75	3.0	10
13	0	0	0	20	38.25	1.5	10

385

386

387

388 **Table 2** List of model coefficients and p-values

389

Coefficient	Value	p-value
b0	10.0	96.6390
b1	-510.6	1.78
b2	1197.5	0.117391
b3	-1094.3	0.158
b11	347.5	29.3392
b22	1330.9	1.48
b33	919.6	3.89393
b12	-516.2	13.8394
b13	1181.3	2.45
b23	-1088.6	3.07395



### 3. IV. 2. CONCLUSIONS

De fortes quantités de géosmine sont produites à basse température, CO<sub>2</sub> ambiant et forte concentration en cuivre. Grâce à la matrice de Doehlert, on a pu observer que la température et la teneur en cuivre sont des facteurs importants dans la production de géosmine. 3150 ng/L de géosmine ont été produites à 20 °C et 63,75 mg/L de cuivre.

Le cuivre résiduel retrouvé sur les raisins, après les traitements par des fongicides, peut stimuler la production de géosmine par *P. expansum*. Néanmoins, avec ce plan à 13 expériences, les conditions conduisant à la production minimale de géosmine ont pu être définies. Cependant, la production de géosmine a été décrite sur milieu gélosé modèle. Elle doit maintenant être confirmée sur matrice raisin.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de cette étude est de répondre aux problèmes posés par l'apparition d'arômes terreux dans les vins, dépréciant ainsi leur qualité et entraînant des pertes pour les viticulteurs.

La principale molécule responsable de ces altérations est la géosmine. Les observations effectuées sur le terrain et les enquêtes auprès des viticulteurs révèlent que le défaut terreux est déjà perçu au niveau de la grappe.

Parmi la microflore indigène de la pellicule du raisin, une partie a été identifiée comme responsable des déviations organoleptiques. *P. expansum* est connu en tant que producteur de géosmine (Dionigi *et al.*, 1996).

La présence de déviations organoleptiques dans des nombreux cépages nous a motivés à une étude approfondie de la microflore des baies de raisins en Bourgogne. L'influence des facteurs environnementaux et nutritionnels, sur le développement des moisissures productrices de géosmine, représente notre principal objectif.

Les résultats obtenus lors de l'identification morphologique et moléculaire ont mis en évidence la présence majoritaire de *Botrytis sp.* et *Penicillium sp.* en Bourgogne, des genres caractéristiques comme contaminants de la vigne (La Guerche *et al.*, 2006).

La validation du modèle prédictif sur baies de raisins, nous a permis de déterminer les taux de croissance des champignons testés, si les conditions avaient été optimales, en tenant compte du fait que certains facteurs intrinsèques du raisin (comme l' $a_w$  interne de la baie) ne peuvent pas être modifiés. Cette étude est un outil indispensable qui pourra être utilisé par la suite, pour valider un modèle prédictif sur d'autres produits alimentaires.

L'effet du cuivre sur le temps de latence et la croissance de *B. cinerea* et *P. expansum* a permis de déterminer les concentrations minimales inhibitrices en cuivre (CMI) correspondantes, lesquelles, à notre connaissance, n'ont pas été précédemment rapportées dans la littérature par le biais des modèles prédictifs. L'originalité de cette étude a été d'utiliser un modèle qui détermine la CMI par l'intermédiaire du temps de latence, dû au comportement spécifique de *B. cinerea* en présence de cuivre, et non pas par l'intermédiaire de la croissance comme cela a été fait auparavant (Dantigny *et al.*, 2005b). Les moisissures testées ce sont montrées résistantes au cuivre, *P. expansum* c'est développé jusqu'à 4 mM de cuivre tandis que les deux souches de *B. cinerea*, BC1 et BC2, jusqu'à 8 et 7 mM de cuivre. Ces concentrations sont donc suffisantes pour contrôler le développement des moisissures

contaminantes de la vigne. Les fongicides doivent être dosés et appliqués en conséquence. La toxicité mesurée au laboratoire doit être confirmée par des expériences dans le vignoble, pour étudier la réponse des moisissures envers une toxicité à long terme due à l'accumulation du cuivre.

Des études peuvent être envisagées afin de déterminer la variation, sur plusieurs années, de la concentration en cuivre sur la pellicule du raisin et étudier la corrélation de celle-ci, avec la présence de *P. expansum* et la quantité de géosmine. Des méthodes de dosage du cuivre sur le raisin ont été déjà mises au point dans le laboratoire.

L'étude des effets combinés de facteurs environnementaux et nutritionnels sur la production de géosmine par *P. expansum* a mis en évidence un accroissement de la production avec l'augmentation de la concentration en cuivre. Ces résultats confirment les résultats antérieurs de Dionigi *et al.*, (1996) et apportent des réponses supplémentaires, car les concentrations testées dans notre étude sont nettement supérieures à celles testées précédemment (1,2 mM par rapport à 0,08 mM). Après 7 jours de culture sur milieu de Czapek, 3150 ng/L de géosmine sont produites par *P. expansum* à 20 °C et à 1 mM cuivre. Le cuivre a un effet activateur sur la production de géosmine et cet effet est maximisé par une température sous-optimale de 20 °C. Cela apporte des informations au niveau du vignoble : notamment durant la période antérieure à la vendange, pendant laquelle la concentration en cuivre sur les raisins est la plus faible, en raison de l'arrêt des traitements par les fongicides, on est alors pour ce facteur dans les conditions minimisant la production de géosmine par *P. expansum*.

En perspective il sera intéressant de comprendre le mécanisme d'action du cuivre sur la production de géosmine. Des expériences ont été menées au laboratoire pour identifier le gène qui code pour l'aristolochène synthase, dernière enzyme qui intervient dans la voie de biosynthèse de la géosmine, déjà décrite chez *P. roqueforti* (Caruthers *et al.*, 2000). Ce travail permettra de donner de bonnes bases pour continuer à élucider la voie de biosynthèse de la géosmine. Par la suite, la (+) aristolochène pourra être déterminée par SPME à partir des cultures de *P. expansum* sur milieu solide supplémenté en cuivre, afin d'étudier si l'effet du cuivre est corrélé à la dernière étape enzymatique dans la voie de biosynthèse de la géosmine (Demyttenaere *et al.*, 2002).

En conclusion, le travail de cette thèse a contribué à la caractérisation d'une espèce (*P. expansum*) responsable du défaut organoleptique dû à la géosmine, au moyen des outils de la mycologie prévisionnelle. Il a permis de tester les effets des facteurs liés à la production de

géosmine, et en particulier de vérifier sur milieu modèle l'effet du cuivre, élément actif des fongicides.

En perspective, une connaissance de la germination de spores de *B. cinerea* et *P. expansum*, en fonction du cuivre, apportera des informations supplémentaires en ce qui concerne les mécanismes de résistance aux fongicides. La méthodologie expérimentale, déjà mise au point durant le travail de Master Recherche (Judet *et al.*, 2008, Annexe 1) pourra être utilisée et adaptée. La germination des spores de *B. cinerea* et *P. expansum* sera observée dans une solution d'eau physiologique supplémentée en cuivre, à travers la boîte de Petri. Les observations microscopiques de la germination peuvent être un point de départ pour la compréhension des mécanismes de résistance au cuivre. Le nouveau modèle de germination qui permet de décrire les différents types de courbes de germination (Dantigny *et al.*, 2011, Annexe 2) sera très utile car on ne connaît pas encore le type de courbe de germination des spores en fonction du cuivre.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### A

- Abramson, D., Sinha, R. N., Mills, J. T., (1980). Mycotoxin and odor formation in moist cereal grain during granary storage. *Cereal Chemistry*, **57**, 346-351.
- Adriano, D. C., (2001). *Trace elements in the terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals*. New York–Berlin–Heidelberg–Tokyo, Springer-Verlag.
- Agger, S. A., Lopez-Gallego, F., Hoye, T. R., Schmidt-Dannert, C., (2008). Identification of sesquiterpene synthases from *Nostoc punctiforme* PCC 73102 and *Nostoc sp.* strain PCC 7120. *Journal of Bacteriology*, **190**, 6084-6096.
- Allen, M. S., Lacey, M. J., Harris, R. L. N., Brown, W. V., (1991). Methoxypyrazines in *Sauvignon blanc* grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **42**, 103-108.
- Alvarez-Rodriguez, M. L., Lopez-Ocana, L., Lopez-Coronado, J. M., Rodriguez, E., Marinez, M. J., Larriba, G. R., Coque, J. J., (2002). Cork taint of wines : role of filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by O-methylation of 2,4,6-trichlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**, 5860-5869.
- Amon, J. M., Vandeppeer, J. M., Simpson, R.F., (1989). Compounds responsible for cork taint in wine. *Wine Industry Journal*, **4**, 62-69.
- Anand, P., Isar, J., Saran, S., Saxena, R. K., (2006). Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresource technology*, **97**, 1018-1025.
- Araya, M., Olivares, M., Pizarro, F., Gonzàles, M., Speisky, H., Uauy, R., (2003). Copper exposure and potencial biomarkers of copper metabolism. *BioMetals*, **16**, 199-204.
- Arias, M., Paradelo, M., López, E., Simal-Gándara, J., (2006). Influence of pH and soil copper on adsorption of metalaxyl and penconazole by the surface layer of vineyard soils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **54**, 8155–8162.
- Arnebrant, K., Baath, E., Nordgren, A., (1987). Copper tolerance of microfungi isolated from polluted and unpolluted forest soil. *Mycologia*, **79**, 890–895.
- Avery, S. V., Howlett, N. C., Radice, S., (1996). Mechanism of adsorption of hard and soft metal ions to *Saccharomyces cerevisiae* and influence of hard and soft anions. *Applied Environmental Microbiology*, **62**, 3960.

### B

- Baranyi, J., Roberts, T. A., McClure, P., (1993). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*, **10**, 43-59.
- Bartnicki-García, S., (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy in fungi. *Annual Review of Microbiology*, **22**, 64-108.
- Basu, S. N., Bose, R. G., Bhattacharyya, J. P., (1955). Some physiological studies on a copper tolerant *Penicillium* species. *Journal of Scientific and Industrial research*, **14**, 46-53.
- Bjurman, J., Kristensson, J., (1992). Production of volatile metabolites by the soft rot fungus *Chaetomium globosum* on building materials and defined media. *Microbios*, **72**, 47-54.

Borkow, G., Gabbay, J., (2005). Copper as a Biocidal Tool. *Current Medicinal Chemistry*, **12**, 2163-2175.

Botton, B., Breton, A., Fevre, M., Gauthier, S., Guy, P., Larpent, J. P., Reymond, P., Sanglier, J. J., Vayssier, Y., Veau, P., (1990). *Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle*. Paris, France : Masson.

Box, G. E. P., Hunter, W. G., (1961). The  $2^{k-p}$  fractional design. *Technometrics*, **3**, 311-351.

Brenes-Pomales, A., Lindegren, G., Lindegren, C. C., (1955). Gene control of copper sensitivity in *Saccharomyces*. *Nature*, **136**, 841-842.

Brun, L. A., Maillet, J., Hinsinger, P., Pépin, M., (2001). Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environmental Pollution*, **111**, 293-302.

Bruns, T. D., White, T. J., Taylor, J. W., (1991). Fungal molecular systematics. *Annual review of Ecology, Evolution and Systematics*, **22**, 525-564.

Buchanan, R. L., Phillips, J. G., (1990). Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium, chloride content, sodium nitrate concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, **53**, 370-376.

## C

Cane, D. E., Kang, I., (2000). Aristolochene synthase: purification, molecular cloning, high-level expression in *Escherichia coli*, and characterization of the *Aspergillus terreus* cyclase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **376**, 354-364.

Cane, D. E., Watt, R. M., (2003). Expression and mechanistic analysis of a germacradienol synthase from *Streptomyces coelicolor* implicated in geosmin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **100**, 1547-1551.

Caruthers, J. M., Kang I., Rynkiewicz M. J., Cane D. E., Christianson D. W., (2000). Crystal structure determination of aristolochene synthase from the blue cheese mold, *Penicillium roqueforti*. *Journal of Biological Chemistry*, **275**, 25533-25539.

Cervantes, C., Gutierrez-Corona, F., (1994). Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, **14**, 121-138.

Chereyathmanjiyil, A., (2001). *Etudes physiologiques et génétiques de souches de Botrytis cinerea collectées dans plusieurs vignobles français*. Thèse de Doctorat : Université de Bourgogne.

Cheyrier, V., Trousdale, E. K., Singleton, V. L., Salgues, M., Wylde, R., (1986). Characterization of 2-S-glutathionylcaftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **34**, 217-221.

Cooksey, D. A., (1990). Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, **28**, 201-219.

## D

Dantigny, P., Guilmart, A., Bensoussan, M., (2003). Predictive mycology: some definitions. *Cryptogamia, Mycologie*, **24**, 377-383.

- Dantigny, P., (2004). Predictive mycology. In : McKellar, R.C., Lu, X. (Eds.), *Modelling Microbial Responses in Food*. CRC Press, Boca Raton, FL, 313-320.
- Dantigny, P., Guilmart, A., Bensoussan, M., (2005a). Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology*, **100**, 187- 196.
- Dantigny, P., Tchobanov, I., Bensoussan, M., Zwietering, M. H., (2005b). Modelling the effect of ethanol vapor on the germination time of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Food Protection*, **68**, 1203-1207.
- Dantigny, P., Bensoussan, M., Vasseur, V., Lebrihi, A., Buchet, C., Ismaili-Alaoui, M., Devlieghere, F., Roussos, S., (2006a). Standardisation of methods for assessing mould germination: A workshop report. *International Journal of Food Microbiology*, **108**, 286-291.
- Dantigny, P., Marín, S., Beyer, M., Magan, N., (2006b). Mould germination: data treatment and modelling. *International Journal of Food Microbiology*, **114**, 17-24.
- Dantigny, P., Nanguy, S. P. M., Correia-Judet, D., Bensoussan, M., (2011). A new model for the germination of fungi. *International Journal of Food Microbiology*, **146**, 176-181.
- Darriet, P., Pons, M., Lamy, S., Dubourdieu, D., (2000). Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 4835-4838.
- Davis, E. M., Croteau R., (2000). Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. *Biosynthesis Aromatic Polyketides Isoprenoids Alkaloids*, **209**, 53–95.
- De Rome, L., Gadd, G. M., (1987). Measurement of copper uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiological Letters*, **43**, 283-287.
- Demyttenaere, J. C. R., Adams, A., Van Belleghem, K., De Kimpe, N., König, W. A., Tkachev, A. V., (2002). *De novo* production of (+)-aristolochene by sporulated surface cultures of *Penicillium roqueforti*. *Phytochemistry*, **59**, 597-602.
- Devez, A., Gomez, E., Gilbin, R., Elbaz-Poulichet, F., Persin, F., Andrieux, P., *et al.*, (2005). Assessment of copper bioavailability and toxicity in vineyard runoff waters by DPASV and algal bioassay. *Science of the Total Environment*, **348**, 82–92.
- Dionigi, C. P., Ingram, D. A., (1994). Effects of temperature and oxygen concentration on geosmin production by *Streptomyces tendae* and *Penicillium expansum*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **42**, 143-145.
- Dionigi, C. P., (1995). The effects of copper sulphate on geosmin biosynthesis by *Streptomyces tendae*, *Streptomyces albidoflavus* and *Penicillium expansum*. *Water Science and Technology*, **31**, 135-138.
- Dionigi, C. P., Champagne, E. T., (1995). Copper-containing aquatic herbicides increase geosmin biosynthesis by *Streptomyces tendae* and *Penicillium expansum*. *Weed Science*, **43**, 196-200.
- Dionigi, C.P., Ahten, T.S., Wartelle, L.H. (1996). Effects of several metals on spore, biomass, and geosmin production by *Streptomyces tendae* and *Penicillium expansum*. *Journal of Industrial Microbiology*, **17**, 84–88.
- Domsh, K. H., Gams, W., Anderson, T. H., (1980). *Compendium of Soil Fungi*, 2 vol., London: Academic Press.

Dubernet, M., Ribéreau-Gayon, P., Lerner, H. R., Harel, E., Mayer, A., (1977). Purification and properties of laccase from *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, **16**, 191-193.

Dumoulin M., Riboulet J.M., (2004). Analyse de géosmine dans les vin : apport de la microextraction en phase solide, (SPME), couplée à l'analyse par GC-SM. *Revue française d'œnologie*, **208**, 28-30.

Durrer, M., Zimmermann, U., Jütner, F., (1999). Dissolved and particle-bound geosmin in a mesotrophic lake (Lake Zürich): spatial and seasonal distribution and the effect of grazers. *Water Resource*, **33**, 3628-3636.

## **E**

EC (European Commission) (2002). Regulation 473/2002 amending Annexes I, II and VI to Council Regulation (EEC) No 2092/91 on organic production of agricultural products and indications referring thereto on agricultural products and foodstuffs, and laying down detailed rules as regards the transmission of information on the use of copper compounds.

## **F**

Fang, S. W., Li, C. F., Shih, D. Y. C., (1994). Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. *Journal of Food Protection*, **57**, 136-140.

Faundez, G., Troncoso, M., Navarette, P., Figueroa, G., (2004). Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiology*, **4**, 19.

Fleet, G.H., (2003). Yeast interactions and wine flavours. *International Journal of Food Microbiology*, **86**, 11-22.

Fleming, C. A., Trevors, J. T., (1989). Copper toxicity and chemistry in the environment: A review. *Water Air Soil Pollution*, **44**, 143-158.

## **G**

Gadd, G. M., (1986). Fungal responses towards heavy metals. In: *Microbes in Extreme Environments* (Herbert, R. A. and Codd, G. A., Eds.), 83-110, London: Academic Press.

Gadd, G. M., Griffiths, A. J., (1978). Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecology*, **317**, 303-317.

Gallo, A., Mule, G., Favilla, M., Altomare, C., (2004). Isolation and characterisation of a trichodiene synthase homologous gene in *Trichoderma harzianum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **65**, 11-20.

García-Esparza, M. A., Capri, E., Pirzadeh, P., Trevisan, M., (2006). Copper content of grape and wine from Italian farms. *Food Additives and Contaminants*, **23**, 274-280.

García-Toledo, A., Babich, H., Stotzky, G., (1985). Training of *Rhizopus stolonifer* and *Cunninghamella blakesleeana* to copper: cotolerance to cadmium, cobalt, nickel, and lead. *Canadian Journal of Microbiology*, **31**, 485-492.

Gerber, N. N., Lechevalier, H. A., (1965). Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes. *Applied Microbiology*, **13**, 935-938.



Gershon, H., Clarke, D. D., Gershon, M. J., (1989). Synergistic antifungal action of 8-quinolinol and its bischelate with copper(II) and with mixed ligand chelates composed of copper(II), 8-quinolinol, and aromatic hydroxy acids. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **78**, 975-978.

Gervais, P., (1990). Water activity: a fundamental parameter of aroma production by microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **33**, 72-75.

Gibson, A. M., Baranyi, J., Pitt, J. I., Eyles, M. J., Roberts, T. A., (1994). Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology*, **23**, 419-431.

Giraud, T. (1998). *Etude de la diversité génétique, du mode de reproduction et de la structure des populations, du champignon phytopathogène Botrytis cinerea*. Thèse de Doctorat : Université de Paris IV.

Glass, N.L., Donaldson, G.C., (1995). Development of primers sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied Environmental Microbiology*, **60**, 1323-1330.

Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T., Chater, K. F., (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **100**, 1541-6.

## H

Harris, N. D., Karahadian, C., Lindsay, R. C., (1986). Musty aroma compounds produced by selected molds and Actynomycetes on agar and whole wheat bread. *Journal of Food Protection*, **49**, 964-970.

Haq, I., Ali, S., Qadeer, M., Iqbal, J., (2002). Effect of copper ions on mould morphology and citric acid productivity by *Aspergillus niger* using molasses based media. *Process Biochemistry*, **37**, 1085-1090.

Hibbett, D. S., Nilsson, R. H., Snyder, M., Fonseca, M., Constanzo, J., Shonfeld, M., (2005). Automated phylogenetic taxonomy: an exemple in the homobasidiomycetes (mushroom-forming fungi). *Systemic Biology*, **54**, 660-668.

Husson, F., Thomas, M., Kermasha, S., Belin, J. M., (2002). Effect of linoleic acid induction on the production of 1-octen-3-ol by the lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities of *Penicillium camemberti*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **20**, 363-369.

## I

Institut Français de la Vigne et du Vin, (2010). *Goûts moisi-terreux : Origine et moyens de lutte*. Itinéraires, 23, Flash Espace.

## J

Jarvis, B., (1977). A chemical method for the estimation of mould in tomato product. *Journal of Food Technology*, **12**, 581-591.

Janssens, L., De Pooter, H. I., Schamp, N. M., Vandamme, E. J., (1992). Production of flavours by microorganisms. *Process Biochemistry*, **27**, 195-215.

Jeleń, H. H., Majcher, M., Zawirska-Wojtasiak, R., Wiewiórowska, M., Wasowicz, E., (2003). Determination of geosmin, 2-methylisoborneol and a musty-earthy odor in wheat grain by SPME-GC-

MS, profiling volatiles, and sensory analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 7079-7085.

Jiang, J., He, X., Cane, D. E., (2007). Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme. *Nature Chemical Biology*, **3**, 711-715.

## K

Khovrycev, M. P., (1973). Absorption of copper ions by cells of *Candida utilis*. *Microbiology*, **42**, 745-749.

King, A.D., Hocking, A.D., Pitt, J.I., (1979). Dichloran Rose-Bengal Medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Applied and Environmental Microbiology*, **37**, 959-964.

Kikuchi, T., Kadota, S., Suehara, H., Nishi, A., Tsubaki, K., Yano, H., Harimaya, K., (1983). Odorous metabolites of fungi, *Chaetomium globosum* Kinze ex Fr., *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. and a blue-green alga, *Phormidium tenue* (Meneghini) Gomont. *Chem Pharm Bull*, **31**, 659-663.

Komárek, M., Cadková, E., Chrastný, V., Bordas, F., Bollinger, J. (2010). Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment international*, **36**, 138-51.

## L

Laforgue, R., Guérin, L., Pernelle, J. J., Monnet, C., Dupont, J., Bouix, M., (2009). Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. *Journal of Applied Microbiology*, **107**, 1208-1218.

La Guerche, S., Pons, M., Darriet, P., (2003). Etude de composés volatils associés à la pourriture des raisins et responsables de défauts olfactifs dans les moûts et les vins. *7th International Symposium of Enology*, Editions Tec & Doc Œnologie, Paris, 22-25.

La Gureche, S., (2004). *Recherches sur les déviations organoleptiques des moûts et des vins associées au développement de pourriture sur les raisins ; Etude particulière de la géosmine*. Thèse de Doctorat : Université de Bordeaux 2.

La Guerche, S., Dauphin, B., Pons, M., Blancard, D., Darriet, P., (2006). Characterization of some mushroom and earthy off-odors microbially induced by the development of rot on grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 9193-200.

Lalezary, S., Pirbazari, M., McGuire, M. J., (1986). Oxidation of five earthy-musty taste and odor compounds. *Journal of American Water Works Association*, **78**, 62-69.

Lamb, D. C., Ikeda, H., Nelson, D. R., Ishikawa, J., Skaug, T., Jacson, C., Omura, S., Waterman, M. R., Kelly, S. L., (2003). Cytochrome P450 complement (CYPome) of the one avermectin-producer *Streptomyces avermitilis* and comparaison to that of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **307**, 610-619.

Lanciotti, R., Guerzoni, M. E., (1993). Competitive inhibition of *Aspergillus flavus* by volatile metabolites of *Rhizopus arrhizus*. *Food Microbiology*, **10**, 367-377.

Larsen, T., Frisvad, J., (1995). Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium* taxa. *Mycological Research*, **99**, 1153-1166.

Leong, S.L., Hocking, A.D., Scott, E.S., (2006). Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *International Journal of Food Microbiology*, **110**, 209-216.

Loureiro, V., Malfeito-Ferrera, M., (2003). Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, **86**, 23-25.

Lebrun-Doaré, E., (2005). *Caractérisation de la microflore des raisins par méthodes FISH et PCR-TTGE ; Application à la résolution des goûts terreux dans les vins*. Thèse de doctorat : ENSIA, Massy.

Li, M., Xue, Q., Zhang, Z., Feng, C., Chen, N., Lei, X., Shen, Z., Sugiura, N., (2010). Removal of geosmin (trans-1, 10-dimethyl-trans-9-decalol) from aqueous solution using an indirect electrochemical method. *Electrochimica Acta*, **55**, 6979-6982.

Lin, X., Cane, D. E., (2009). Biosynthesis of the sesquiterpene antibiotic albaflavenone in *Streptomyces coelicolor*. Mechanism and stereochemistry of the enzymatic formation of epi-isozizaene. *Journal of the American Chemical Society*, **131**, 6332-6333.

Little, M., Krauhs, E., Ponstingl, H., (1981). Tubulin sequence conservation. *BioSystems*, **14**, 239-246.

Lu, G., Fellman, J. K., Edwards, C. G., Mattinson, D. S., Navazio, J., (2003). Quantitative determination of geosmin in red beets (*Beta vulgaris* L.) using headspace solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 1021-5.

Lundsgaard, K., Prochazka, V., Fuchs, N., (2004). *Le cuivre est plus qu'un simple métal lourd : l'utilisation du cuivre comme produit phytosanitaire en viticulture biologique*. Etude bibliographique.

## M

Mattheis, J. P., Roberts, R. G., (1992). Identification of geosmin as a volatile metabolite of *Penicillium expansum*. *Applied Environmental Microbiology*, **58**, 3170-3172.

McKean, P. G., Vaughan, S., Gull, K., (2001). The extended tubulin superfamily. *Journal of Cell Science*, **114**, 2723-2733.

Mislivec, P. B., Tuite, J. (1970). Temperature and relative humidity requirements of species of *Penicillium* isolated from yellow dent corn kernels. *Mycologia*, **62**, 75-88.

## N

Nair, N. G., (1985). Fungi associated with bunch rot of grapes in the Hunter Valley. *Australian Journal of Agricultural Research*, **36**, 435-442.

## O

ONIVINS, (2005). *Caractère moisi terreux des vins : origine et prévention*. Note de synthèse.

## P

Panasenko, V.T., (1967). Ecology of microfungi. *Botanic Reviews*, **33**, 189-215.

Parat, C., Chaussod, R., Lévêque, J., Dousset, S., Andreux, F., (2002). The relationship between copper accumulated in vineyard soils and soil organic matter and iron. *European Journal of Soil Science*, **53**, 663-669.

Paton, W. H. N., Budd, K., (1972). Zinc uptake in *Neocosmopora vasinfecta*. *Journal of General Microbiology*, **72**, 173-184.

Pateraki, M., Dekanea, A., Mitchell, D., Lydakis, D., Magan, M., (2007). Influence of sulphur dioxide, controlled atmospheres and water availability on *in vitro* germination, growth and ochratoxin A production by strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *Postharvest Biology and Technology*, **44**, 141-149.

Peterson, S. W., (2004). Multilocus DNA sequence analysis shows that *Penicillium biourgeianum* is a distinct species closely related to *P. brevicompactum* and *P. olsonii*. *Mycological research*, **108**, 434-440.

Phelan, A., Thurman, D. A., Tomsett, A. B., (1990). The isolation and characterization of copper-resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Current Microbiology*, **21**, 255-260.

Pickett, A. W., Dean, A. C. R., (1976). Cadmium and zinc sensitivity and tolerance in *Klebsiella (Aerobacter) aerogenes*. *Microbiology*, **15**, 79-91.

Pietrzak, U., McPhail, D. C., (2004). Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. *Geoderma*, **122**, 151-166.

Pisarnitskii, A. F., Egorov, I. A., (1988). Low molecular weight metabolites produced by various *Penicillium* species. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, **24**, 760-764.

Pitt, J. I., (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London: Academic Press.

Pitt, J. I., (1985). Laboratory guide to common *Penicillium* species. CSIRO Divison of Food Research. North Ryde, New South Wales, Australia.

Pitt, J. I., Hocking, A. D., (1999). Fungi and food spoilage, 2<sup>nd</sup> ed. Gaithersburg: Aspen Publishers.

Proctor, R. H., Hohn, T. M., (1993). Aristolochene synthase. Isolation, characterisation and bacterial expression of a sesquiterpenoid biosynthetic gene (Ari1) from *Penicillium roqueforti*. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 4543-4548.

Polak, E. H., Trotier, D., Baliguet, E., (1978). Odor sensitivity to geosmin enantiomers. *Chemical Senses*, **17**, 23-26.

## **R**

Ramirez-Salgado, P., Caracheo-Aguilar, S., Obregon-Herrera, A., Sosa-Luna, L., Amezcuita-Lopez, F., Mendoza-Diaz, G., Gutiérrez-Corona, F., (1996). Copper Resistance and Accumulation in the Zygomycete *Mucor rouxii*. *Current microbiology*, **33**, 163-166.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., (2004). *Traité d'œnologie, Tome 1 ; Microbiologie du vin*. Paris : Vinifications.

Richard-Molard, D., Cahagnier, B., Poisson, J., Drapon, R., (1976). Evolutions comparées des constituants volatils et de la microflore de maïs stockés sous différentes conditions de température et d'humidité. *Annales de Technologie Agricole*, **25**, 29-44.

Ross, T., (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*, **91**, 501-508.

Rosso, L., Lobry, J. R., Flandrois, J. P., (1993). An unexpected correlation between cardinal temperature of microbial growth highlighted by a new model. *Journal of Theoretical Biology*, **162**, 447-463.

Rouch, D. A., Lee, B. T., Morby, A. P., (1995). Induction of bacterial mercury-and copper-responsive promoters: functional differences between inducible systems and implications for their use in gene-fusions for in vivo biometal sensors. *Journal of Industrial Microbiology*, **14**, 132.

Rynkiewicz, M. J., Cane D. E., Christianson D. W., (2001). Structure of trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* provides mechanistic inferences on the terpene cyclization cascade. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the USA*, **98**, 13543–13548.

## S

Samson, R. A., Seifert, K. A., Kuijpers, A. F. A., Houbraeken, J. A. M. P., Frisvad, J. C., (2004a). Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial  $\beta$ -tubulin sequences. *Studies in Mycology*, **49**, 175-200.

Samson, R.A., Frisvad, J.C., (2004b). *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycology*, 49: V-V.

Saitoh, Y., Izumitsu, K., Tanaka, C., (2009). Phylogenetic analysis of heavy-metal ATPases in fungi and characterisation of the copper-transporting ATPase of *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycological Research*, **113**, 737-745.

Sau, D. K., Butcher, R. J., Chaudhuri, S., Saha, N., (2003). Spectroscopic, structural and antibacterial properties of copper(II) complexes with bio-relevant 5-methyl-3-formylpyrazole N(4)-benzyl-N(4)-methylthiosemicarbazone. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 253, 21.

Sautour, M., Rouget, A., Dantigny, P., Divies, C., Bensoussan, M., (2001a). Prediction of conidial germination of *Penicillium chrysogenum* as influenced by temperature, water activity and pH. *Letters in Applied Microbiology*, **32**, 131-134.

Sautour, M., Dantigny, P., Divies, C., Bensoussan, M., (2001b). Application of Doehlert design to determine the combined effects of temperature, water activity and pH on conidial germination of *Penicillium chrysogenum*. *Journal in Applied Microbiology*, **91**, 900-906.

Sautour, M., Dantigny, P., Guilhem, M. C., Bensoussan, M., (2003). Influence of inoculum preparation on the growth of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Applied Microbiology*, **95**, 1034-1038.

Scholler, C. E., Gurtler, H., Pedersen, R., Molin, S., Wilkins, K., (2002). Volatile metabolites from actinomycetes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50**, 2615-2621.

Schnürer, J., Olsson, J., Börjesson, T., (1999). Fungal volatiles as indicators of food and feeds spoilage. *Fungal Genetics and Biology*, **27**, 209-217.

Scott, J. A., Palmer, S., (1990). Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **33**, 221-225.

Shulz, S., Fuhendorff, J., reichenbach, H., (2004). Identification and synthesis of volatiles released by the myxobacterium *Chondromyces crocatus*. *Tetrahedron*, **60**, 3863-3872.

Simbarashe, S., (2006). *Post-harvest strategies for the prevention of fungal growth and mycotoxin production in corn*. PhD Thesis: Universiteit Gent.

Sung, Y., Li, T., Huang, S., (2005). Analysis of earthy and musty odors in water samples by solid-phase microextraction coupled with gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Talanta*, **65**, 518-524.

## T

Turner, W. B., Aldridge, D. C., (1983). *Fungal Metabolites*, vol. 2, London: Academic Press.

Tuthill, D. E., Frisvad, J. C., (2004). A new species from tropical soils, *Eupenicillium tropicum*. *Mycological Progress*, **3**, 13-18.

## V

van den Ent, F., Amos, L. A., Löwe, J. (2001). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature*, **413**, 39-44.

Venkateswerlu, G., Sastry, K. S., (1970). The mechanism of uptake of cobalt ions by *Neurospora crassa*. *Biochemical Journal*, **118**, 497-503.

Verscheure, M., Lognay, G., Marlier, M., (2002). Revue bibliographique : les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. *Structure*, **6**, 131-142.

## W

Wang, D. Y. C., Kumar, S., Hedges, S. B., (1999). Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proceedings of the Royal Society: B*, **266**, 163-171.

Whittaker, R. H., (1969). New concepts in kingdoms of organisms. *Science*, **163**, 150-160.

Wijtzes, T., van'T Riet, K., Huis in't Veld, J. H. J., Zwietering, M. H., (1998). A decision support system for the prediction of microbial food safety and food quality. *International Journal of Food Microbiology*, **42**, 79-90.

## Y

Yamamoto, H., Tatsuyama, K., Uchiwa, T., (1985). Fungal flora of soil polluted with copper. *Soil Biological Biochememistry*, **17**, 785-790.

Yano, T., Koga, S., (1973). Dynamic behaviour of the chemostat subject to product inhibition. *The Journal of General and Applied Microbiology*, **19**, 97-114.

Yong, L., (1992). The effect of carbon and nitrogen sources on the growth and aroma production of *Penicillium italicum*. In: *Food Science and Human Nutrition* (ed. G. Charalambous), 115-122. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV.

## Z

Zafar, S., Aqil, F., Ahmad, I., (2007). Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource Technology*, **98**, 2557-2561.

Zapotoczny, S., Jurkiewicz, A., Tylko, G., Anielska, T., Turnau, K., (2007). Accumulation of copper by *Acremonium pinkertoniae*, a fungus isolated from industrial wastes. *Microbiological Research*, **162**, 219-228.

Zatcoff, R. C., Smith, M. S., Borkow, G., (2008). Treatment of tinea pedis with socks containing copper-oxide impregnated fibers. *The Foot*, **18**, 136-141.

## Sites internet

[http://www.phylogeny.fr/version2\\_cgi/alacarte.cgi](http://www.phylogeny.fr/version2_cgi/alacarte.cgi) (consulté mai 2010)

<http://www.cbs.knaw.nl> (consulté courant 2009)

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (consulté février 2010)

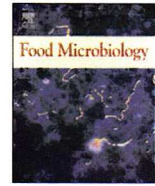
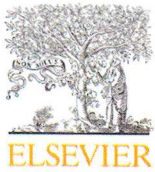
[http://www.beckmangenomics.com/genomic\\_services/dna\\_sequencing.html](http://www.beckmangenomics.com/genomic_services/dna_sequencing.html) (consulté courant 2009)

<http://www.mycobank.org/mycotaxo.aspx> (consulté courant 2010)

<http://www.vitisphere.com> (consulté septembre 2010)

## **ANNEXE 1**





## Distributions of the growth rate of the germ tubes and germination time of *Penicillium chrysogenum* conidia depend on water activity

Daniela Judet<sup>a</sup>, Maurice Bensoussan<sup>b</sup>, Jean-Marie Perrier-Cornet<sup>a</sup>, Philippe Dantigny<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires, Université de Bourgogne, ENS.BANA, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France

<sup>b</sup> GTR Mycologie et Sécurité Microbiologique des Aliments et de l'Environnement, Université de Bourgogne, ENS.BANA, Dijon, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 January 2008

Received in revised form

13 May 2008

Accepted 15 May 2008

Available online 28 May 2008

#### Keywords:

Distribution

Spores

Conidia

Fungi

Mould

*Penicillium*

Germination

Water activity

Predictive mycology

### ABSTRACT

The effects of water activities for sporulation ( $a_{wsp}$ ) and germination ( $a_{wge}$ ) on the distributions of the growth rate of the germ tubes ( $\mu$ ) and the germination time ( $t_G$ ) of *Penicillium chrysogenum* conidia were determined by monitoring the length of the same germ tubes throughout the experiments automatically. No relationship between the individual  $t_G$ 's and  $\mu$ 's could be established. Irrespective of the water activity for germination,  $\mu$  was greater and  $t_G$  was less for conidia produced at  $0.95a_{wsp}$  than that at  $0.99a_{wsp}$ . At  $0.99a_{wge}$  the mean and the standard deviation of  $t_G$  were smaller than those obtained at  $0.95a_{wge}$ . At  $0.99a_{wge}$ , normal distributions for  $\mu$  and  $t_G$  were exhibited, but not at  $0.95a_{wge}$ . The cumulative frequencies were used to reconstruct the germination curves. Great differences in the percentage of spores capable of germination ( $P_G$ ) and in the mean germination times between conidia produced at  $0.95a_{wsp}$  and at  $0.99a_{wsp}$  were clearly exhibited at  $0.95a_{wge}$ , thus demonstrating the paramount influence of sporulation conditions on germination kinetics.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Most of the experiments that concerned growth of bacteria and moulds were carried out using a large inoculum. However, in most cases, products are contaminated by a low initial level of organisms. In some cases this level maybe as low as a single spore. Therefore, for improving the prediction of microbial growth, the distribution of kinetic parameters such as the lag time should be determined (Dantigny et al., 2007). The effects of water activity ( $a_w$ ) and temperature ( $T$ ) on the distribution of radial growth rate ( $g$ ) and lag time ( $\lambda$ ) for growth of single spores of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* were assessed (Samapundo et al., 2006). All the distributions were normal. The standard deviations were increased by decreasing the  $a_w$ , but the effect of  $T$  on the distributions was less clear.

Germination can be considered as the main step to be focused on, because a product is spoiled as soon as visible hyphae can be observed (Dantigny et al., 2005). For a single spore, the germination time is defined as the time at which the length of the germ tube was equal to the greatest dimension of the swollen spore (Dantigny et al., 2006). It is well known that spores did not

germinate at the same time, but the distribution of the growth rate of germ tubes ( $\mu$ ) and the germination time ( $t_G$ ) amongst a population of spores has not been examined yet.

Water activity ( $a_w$ ) was the main factor for explaining the variability of the time to obtain 90% germinated spores (Sautour et al., 2001b). Reduced  $a_w$  has the effect of reducing the mean rate of extension of the germ tube, in addition to increasing the mean germination time (Tomkins, 1929; Heintzeler, 1939; Snow, 1949; Charlang and Horowitz, 1971; Pascual, 1998). It is suggested that  $a_w$  may have a great influence on the distributions on the germination parameters,  $\mu$  and  $t_G$ .

This study aimed at assessing, not only the effects of the water activity for germination ( $a_{wge}$ ), but also those of the water activity for sporulation ( $a_{wsp}$ ) on the distributions of  $\mu$  and  $t_G$ . It was shown that germination plots generated for normal distributions were symmetrical with respect to the inflection point and should be fitted by the logistic model (Dantigny et al., 2007). These authors have also demonstrated that asymmetric germination curves can be simulated assuming skewed distributions. Therefore, the distributions described in this study were tested for normality, the skewness coefficients were evaluated and the germination curves were redrawn from the cumulative frequencies. It was the purpose of this study to analyse the frequency distributions of the parameters germ tube growth rate and germination time in *Penicillium chrysogenum* and to derive

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 8039 6671; fax: +33 3 8039 6640.  
E-mail address: [phdant@u-bourgogne.fr](mailto:phdant@u-bourgogne.fr) (P. Dantigny).

hypothesis about the biological and mechanistic reasons resulting in different frequency distributions.

## 2. Material and methods

### 2.1. Mould and media

*P. chrysogenum* was maintained on potato dextrose agar (PDA) medium (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) at room temperature (18–25 °C). The media for spore production and spore germination was PDA. The initial pH for all experiments was  $5.7 \pm 0.1$ . Water activity ( $a_w$ ) in these media was adjusted by substituting part of the water with an equal weight of glycerol (Gervais et al., 1988).

### 2.2. Spore production

The PDA medium was adjusted to  $0.95a_{wsp}$  and  $0.99a_{wsp}$  and was incubated at 25 °C for 7 d. Spores were collected by flooding the surface of the plates with 4.5 ml of sterile saline solution (NaCl,  $9 \text{ g l}^{-1}$  of water) containing Tween 80 (0.05% vol/vol; Prolabo, Paris, France) and glycerol for keeping  $a_w$  at the set value. After counting the spores on a Malassez cell, the spore suspensions were standardised to  $1 \times 10^6$  spores  $\text{ml}^{-1}$  for further examination of about 20–50 spores per microscopic field.

### 2.3. Spore germination

The device used in this study was made from a Petri dish and was described previously (Sautour et al., 2001a). The PDA medium was adjusted to  $0.95a_{wge}$  and  $0.99a_{wge}$  and was poured on the internal side of the lid of the Petri dish. In order to equilibrate the relative humidity inside each device after inoculation, an appropriate water/glycerol solution (15 ml) was poured into the Petri dish. The water activity of this solution was identical to that of the culture medium tacked to the lid. The devices sealed with Parafilm® constituted the closed incubation chambers. After solidification, the medium was inoculated with  $10 \mu\text{l}$  of the standardized suspensions.

### 2.4. Germ tubes monitoring

Without opening the devices, spores (20–50 per microscopic field) were examined through the Petri dish lid every 15 min for a maximum duration of 3 d. In order to examine about 100 spores per experimental condition, experiments were repeated twice to four times depending on the experiment. The temperature was  $20 \pm 1$  °C. The length of the germ tube was measured by means of a Leica DMLB ( $\times 400$ ) (Leica, Rueil-Malmaison, France) connected to a Kodak Mega Plus E.S. 1.0 (Kodak, San Diego, CA) camera. Pictures were analysed using Matrox Inspector 2.2 (Matrox Electronics Systems Ltd, Dorval, Canada). The length of the germ tube ( $l$ ) was plotted against time. Prior to pooling the data, a Student *t*-test was performed for comparing the variance and the mean. The growth rate of the germ tube ( $\mu$ ) was evaluated from the slope of the straight line. The germination time ( $t_G$ ) was the time at which the length of the germ tube equalled one spore diameter and was determined as the intercept between the straight line and the spore diameter (approximately  $10 \mu\text{m}$ ).

### 2.5. Model fitting

Germination data were obtained by calculating the cumulative frequencies. Two models for fitting the germination data

were used:

The Gompertz equation :

$$P = A \exp\left(-\exp\left[\frac{\mu_m e(1)}{A}(\delta - t) + 1\right]\right) \quad (1)$$

where  $A$  (%) was the asymptotic  $P$  value at  $t \rightarrow +\infty$ ,  $\mu_m$  (%  $\text{h}^{-1}$ ) was the slope term of the tangent line through the inflection point ( $t_i$ ) as defined further,  $\delta$  (h) was the  $t$ -axis intercept of the tangent through the inflection point and  $t$  was the time (h). The inflection point was determined as follows (Dantigny et al., 2003):

$$t_i = \delta + A/(\mu_m e(1)) \quad (2)$$

$$\text{The logistic function : } P = \frac{P_{\max}}{1 + \exp[k(\tau - t)]} \quad (3)$$

where  $P_{\max}$  (%) was the asymptotic  $P$  value at  $t \rightarrow +\infty$ ,  $\tau$  (h) was the inflection point where  $P$  equals half of the  $P_{\max}$ ,  $t$  was the time (h) and the slope of the tangent line through the inflection point was  $k P_{\max}/4$ ,  $k$  ( $\text{h}^{-1}$ ) (Dantigny et al., 2006).

### 2.6. Statistics

The distributions of  $\mu$  and  $t_G$  were analysed using Analyse it® software that is based on the Shapiro–Wilkinson test. Non-linear regressions were performed by SlideWrite 5.0 (Advanced Graphics Software, Inc., Carlsbad, CA, USA). This software was based upon the Levenberg–Marquardt Algorithm. The goodness of fit was evaluated by means of the root mean square error (RMSE) and extracted from ANOVA tables.

## 3. Results

### 3.1. Germ tubes elongation

The growth rate of the germ tube was plotted against the germination time for each spore, Fig. 1. At  $0.99a_{wge}$ , the germination time did not depend on the water activity for sporulation,  $9.9 \pm 0.8$  h and  $11.4 \pm 1.0$  h at  $0.95a_{wsp}$  and at  $0.99a_{wsp}$  respectively, Table 1. But, at  $0.95a_{wsp}$ , the variance was 3-fold that one obtained at  $0.99a_{wsp}$ , Table 1. An increase of the mean growth rate of germ tube can also be observed with decreasing the mean germination time. The same observation was made at  $0.95a_{wge}$ . The mean growth rate at  $0.95a_{wsp}$ , 4.19 h, was greater than that one at  $0.99a_{wsp}$ , 2.23 h, whereas the mean germination time at  $0.95a_{wsp}$ , 35.1 h, was smaller than that one obtained at  $0.99a_{wsp}$ , 45.9 h, Table 1.

However, the increase of the mean growth rate of the germ tubes with decreasing the mean germination time that was observed at  $0.99a_{wge}$  and  $0.95a_{wge}$  was no longer true if the experiments carried out at the same water activities for sporulation and for germination were compared. At  $0.95a_{wsp}$  and  $0.95a_{wge}$ , the mean growth rate of germ tubes was not significantly different than that one obtained at  $0.99a_{wsp}$  and  $0.99a_{wge}$ , Table 1. But at  $0.99a_{wsp}$  and  $0.99a_{wge}$ , the mean germination time was much smaller, 11.4 h, than that one calculated at  $0.95a_{wsp}$  and  $0.95a_{wge}$ , 35.1 h. Moreover, no correlation between individual growth rate of the germ tubes and the germination time was found.

### 3.2. Distributions of the growth rates of the germ tubes

At  $0.95a_{wsp}$  and  $0.95a_{wge}$ , the  $W_{\text{value}}$ , 0.974, was not significant at the significance level  $\alpha = 0.05$ , Table 1. In contrast, the skewness coefficient,  $S = 0.554$ , was significant. A positive



skewness coefficient means a longer right tail (more density of data on the left hand of the distribution), Fig. 2a.

At  $0.99a_{wsp}$  and  $0.95a_{wge}$ , the positive skewness value, 1.279, was even higher and highly significant,  $P < 0.001$ , and clearly showed that the distribution was not centred, Fig. 2b. As compared to the mean growth rate,  $\mu = 2.23 \mu\text{m h}^{-1}$ , the density of data on the left hand of the distribution (cumulative frequency of about 47) was greater than that on the right hand (cumulative frequency of about 17). In these conditions, the  $W_{\text{value}}$ , 0.886, was significantly less than 0.947, thus demonstrating that  $\mu$  was not normally distributed, Table 1.

At  $0.99a_{wge}$ , whatever  $a_{wsp}$  was,  $W$  values were greater than 0.947 and significant at the significance level  $\alpha = 0.05$ , Table 1. In these conditions,  $\mu$  values were normally distributed, Fig. 2c and d. None of the skewness coefficients was significant.

### 3.3. Distributions of the germination time

At  $0.95a_{wsp}$  and  $0.95a_{wge}$ , the positive skewness value, 0.987, was highly significant,  $P < 0.001$ , and demonstrated clearly that the distribution was not centred. The smoothing curve exhibited a

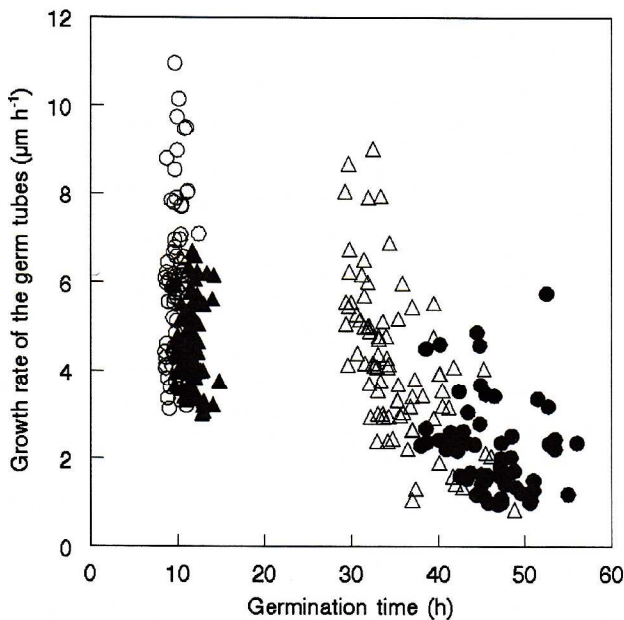


Fig. 1. Growth rate of the germ tubes vs germination time of *Penicillium chrysogenum* conidia at (Δ)  $0.95a_{wsp}/0.95a_{wge}$ ; (●)  $0.99a_{wsp}/0.95a_{wge}$ ; (▲)  $0.95a_{wsp}/0.99a_{wge}$ ; (○)  $0.99a_{wsp}/0.99a_{wge}$ .

Table 1

Influence of the water activities for sporulation ( $a_{wsp}$ ) and for germination ( $a_{wge}$ ) on the distributions of growth rate of the germ tubes ( $\mu$ ) and germination time ( $t_G$ ) of *Penicillium chrysogenum*

Experimental conditions	$n_{\text{obs}}$	$n_{\text{ger}}$	$P_G$ (%)	$\mu$		$t_G$											
						Mean ( $\mu\text{m h}^{-1}$ )		Normality		Skewness		Mean (h)		Normality		Skewness	
								W	P-value	S	P-value			W	P-value	S	P-value
						Var ( $\mu\text{m}^2 \text{h}^{-2}$ )	W	P-value	S	P-value	W	P-value	S	P-value			
$0.95a_{wsp}; 0.95a_{wge}$	172	82	47.7	4.19	3.01	0.974	0.089	0.554	0.040	35.1	18.8	0.923	<0.001	0.987	<0.001		
$0.99a_{wsp}; 0.95a_{wge}$	99	64	64.6	2.23	1.09	0.886	<0.001	1.279	<0.001	45.9	18.6	0.981	0.408	0.298	0.306		
$0.95a_{wsp}; 0.99a_{wge}$	74	71	95.9	6.07	3.17	0.964	0.037	0.552	0.055	9.9	0.6	0.966	0.048	0.426	0.131		
$0.99a_{wsp}; 0.99a_{wge}$	88	88	100	4.55	0.80	0.971	0.045	0.416	0.104	11.4	1.0	0.967	0.024	0.585	0.026		

$W_{\text{table}} = 0.947$  for  $n > 50$  at  $\alpha = 5\%$ ,  $n_{\text{obs}}$ : number of spores observed;  $n_{\text{ger}}$ : number of spores germinated used for constructing the distributions;  $P_G = n_{\text{ger}}/n_{\text{obs}}$ : maximum percentage of spores capable of germination.

maximum frequency approximately at 32.5 h, Fig. 3a. More density was observed in the left-hand side of the distribution, thus the skewness coefficient was positive. The  $W_{\text{value}}$ , 0.923, was significantly less than 0.947, thus demonstrating that  $t_G$  was not normally distributed, Table 1.

At  $0.99a_{wsp}$  and  $0.95a_{wge}$ , none of the  $W$  and skewness values was significant, Table 1. The density distribution was shown in Fig. 3b.

At  $0.95a_{wsp}$  and  $0.99a_{wge}$ , the mean germination time was 9.9 h, Table 1. The skewness coefficient was not found significant, Table 1. In contrast, the  $W_{\text{value}}$  was significantly greater than 0.947, thus suggesting that  $t_G$  values were normally distributed, Fig. 3c.

At  $0.99a_{wsp}$  and  $0.99a_{wge}$ , both the  $W$  and the skewness values were significant, Table 1. In these conditions,  $t_G$  values were normally distributed, Fig. 3d.

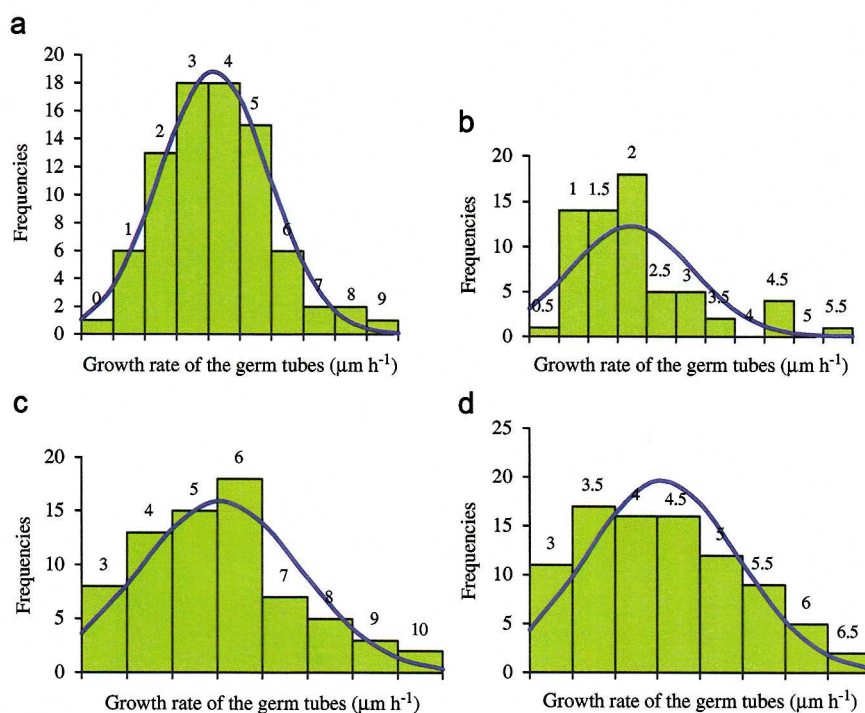
### 3.4. Modelling of the germination curves

The germination curves were reconstructed from the cumulative frequencies of the germination time as described Fig. 3. In all cases, but for the Gompertz equation at  $0.99a_{wsp}; 0.95a_{wge}$ , the ratio,  $n_{\text{ger}}/n_{\text{obs}}$ , was within the 95% confidence intervals for  $A$  or  $P_{\text{max}}$ . Normal distributions were obtained at  $0.99a_{wge}$ . It was shown from the RMSE values that the logistic model performed better than the Gompertz equation, Table 2. At  $0.99a_{wsp}; 0.99a_{wge}$ , the normal distribution of  $t_G$  was skewed,  $S = 0.585$  ( $P = 0.026$ ). For a strictly normal, centred distribution,  $t_G$  should be equal to the value of  $\tau$  at the inflection point of the logistic model. Due to skewness, in addition to non-strictly normal distribution, the mean germination time,  $t_G = 11.4$  h, was greater than  $\tau = 10.6$  h, Tables 1 and 2.

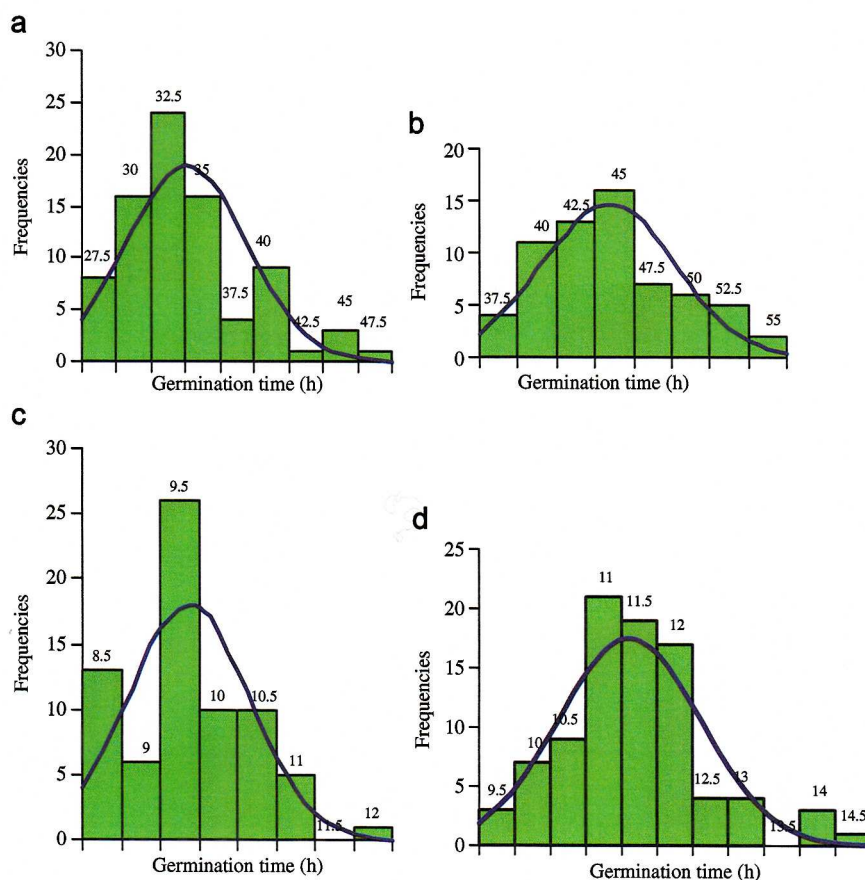
In contrast, at  $0.95a_{wge}$ , the non-normal distributions were fitted better by the Gompertz equation as illustrated by the RMSE values, Table 2. The variance of  $t_G$  were greater at  $0.95a_{wge}$  than at  $0.99a_{wge}$ , Table 1. Accordingly, the slopes of the germination curves at  $0.95a_{wge}$  were less than those obtained at  $0.99a_{wge}$ , Fig. 4.

## 4. Discussion

From the data of Snow (1949), a non-linear relationship between the mean growth rate of the germ tubes and the mean germination time was established (Dantigny et al., 2007). It was also demonstrated that the non-linear coefficient depended upon the medium. An increase of the mean radial growth rate with decreasing the mean germination time was also shown in this study. However, the mean growth rate of the germ tubes was not significantly different at  $0.95a_{wsp}; 0.95a_{wge}$  and at  $0.99a_{wsp}; 0.99a_{wge}$  thus suggesting that such a relationship should also be



**Fig. 2.** Observed and smoothed (continuous curve) density distributions of the growth rate of the germ tubes of *Penicillium chrysogenum* at (a)  $0.95a_{wsp}/0.95a_{wge}$ ; (b)  $0.99a_{wsp}/0.95a_{wge}$ ; (c)  $0.95a_{wsp}/0.99a_{wge}$ ; (d)  $0.99a_{wsp}/0.99a_{wge}$ .



**Fig. 3.** Observed and smoothed (continuous curve) density distributions of the germination time of *Penicillium chrysogenum* at (a)  $0.95a_{wsp}/0.95a_{wge}$ ; (b)  $0.99a_{wsp}/0.95a_{wge}$ ; (c)  $0.95a_{wsp}/0.99a_{wge}$ ; and (d)  $0.99a_{wsp}/0.99a_{wge}$ .

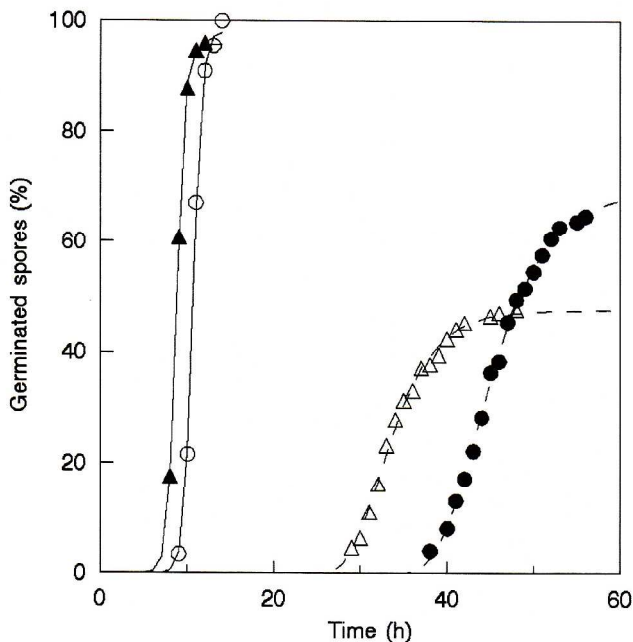


**Table 2**

Parameter estimate [95% confidence interval] and RMSE values obtained by fitting *Penicillium chrysogenum* germination plots at different  $a_w$  for sporulation and for germination with the Gompertz and the logistic models

Experimental conditions	Model							
	Gompertz				Logistic			
	A (%)	$\mu_m$ (% h <sup>-1</sup> )	$\delta$ (h)	RMSE	$P_{max}$ (%)	$k$ (h <sup>-1</sup> )	$\tau$ (h)	RMSE
0.95 $a_{wsp}$ ; 0.95 $a_{wge}$	47.6 [46.2, 49.0]	4.96 [4.55, 5.37]	28.6 [28.2, 29.0]	<b>1.114</b>	46.2 [44.4, 48.0]	0.415 [0.351, 0.479]	33.5 [33.1, 33.9]	2.858
0.99 $a_{wsp}$ ; 0.95 $a_{wge}$	69.3 [66.9, 71.6]	5.68 [5.35, 6.02]	38.9 [38.6, 39.2]	<b>1.076</b>	64.8 [63.0, 66.7]	0.361 [0.330, 0.393]	44.8 [44.5, 45.1]	1.580
0.95 $a_{wsp}$ ; 0.99 $a_{wge}$	97.5 [92.7, 102.4]	47.9 [39.2, 56.7]	7.67 [7.48, 7.85]	1.750	95.6 [93.2, 97.9]	2.007 [1.754, 2.260]	8.73 [8.66, 8.80]	<b>0.594</b>
0.99 $a_{wsp}$ ; 0.99 $a_{wge}$	99.8 [94.0, 105.6]	49.2 [38.1, 60.4]	9.57 [9.34, 9.79]	4.754	97.9 [94.1, 101.8]	1.989 [1.615, 2.364]	10.6 [10.5, 10.7]	<b>3.032</b>

Bold values indicated a better fit.



**Fig. 4.** Germination curves obtained for *P. chrysogenum* at ( $\Delta$ ) 0.95 $a_{wsp}$ /0.95 $a_{wge}$ ; ( $\bullet$ ) 0.99 $a_{wsp}$ /0.95 $a_{wge}$ ; ( $\blacktriangle$ ) 0.95 $a_{wsp}$ /0.99 $a_{wge}$ ; ( $\circ$ ) 0.99 $a_{wsp}$ /0.99 $a_{wge}$ . Fitting models: (—) logistic model; (---) Gompertz equation.

dependent on the water activity for germination. But, no relationship between the individual growth rate of germ tube and germination time could be determined.

It was shown that, by carefully standardizing the inoculum size, the mean germination time can be substituted for the mean lag time for growth (González et al., 1987; Dantigny et al., 2002). In the objective of substituting a microscopic observation from a macroscopic one, the distributions of the lag time for growth and colony growth rates from single spores of *A. flavus* and *F. verticillioides* were assessed (Samapundo et al., 2006). The colony growth rate depends on the rate of elongation of the leading hyphae spanning the colony's peripheral zone (Trinci, 1971a). In addition, the growth rate of the germ tubes, that is initially constant, subsequently decreases (Trinci, 1971b). Therefore, the distribution of the growth rate of the colony does not necessarily mirror that of the germ tubes. In the objective of assessing the distributions of the germination time indirectly

through macroscopic measurements of the radius of the colony, it would be very interesting to measure the growth rate of the germ tube and the resulting colony growth rate of the same spores.

In this study, it was shown that the standard deviation in the germination time at 0.95 $a_w$  was greater than at 0.99 $a_w$ . It was reported that the standard deviations of the lag time for growth in *A. flavus* were greater at 0.88 $a_w$  than at 0.98 $a_w$  and were greater at 0.92 $a_w$  than at 0.98 $a_w$  in *F. verticillioides* (Samapundo et al., 2006). The increase of the standard deviation of the germination time is synonymous with a decrease of the slope of the germination curve that has been observed for example by decreasing  $a_w$  (Marín et al., 1996). A positive skewness coefficient for the distribution of  $t_G$  was obtained at 0.95 $a_{wsp}$  and 0.95 $a_{wge}$ . It was shown previously through simulation that cumulative frequencies calculated from such a skewed distribution could be better fitted by the Gompertz equation. Our study demonstrated that skewed distributions of the germination time can be observed experimentally at 0.95 $a_{wge}$ . The skewed distributions were not characterised, this could be done once more non-normal distributions will be accumulated.

A decrease in the slope of the germination curve with increasing the age of conidia was reported (Kawanabe, 1986; Araujo and Gonçalves Rodrigues, 2004). A greater standard deviation in the germination time was shown at a low water activity for sporulation. But this could not be explained entirely by the effect of the age of the conidia. In this study, all conidia were harvested from mycelium aged 7 d. Therefore the age distribution amongst the conidia was not greatly affected by differences in the water activity for sporulation. The production of the first conidia at 0.95 $a_w$  was delayed for about 1d as compared to that at 0.99 $a_w$ . Below 0.95 $a_w$ , mature mycelium did not produce conidia within 7 d. Accordingly water activities less than 0.95 were not tested. This could be done in a next step, when the influence of the age of the conidia on the distributions of the germination and the growth rate of the germ tube would have been assessed.

Inoculum concentration was also proved to be a critical factor in controlling the rate of germination (Ryan, 1948; Araujo and Gonçalves Rodrigues, 2004). Germination was inhibited when spores are present in high densities, an effect observed for example in *Aspergillus niger* and the zygomycete *Syncephalastrum racemosum* (Hobot and Gull, 1980; Barrios-González et al., 1989). Self-inhibitors inhibit spore germination reversibly. The major function of self-inhibitors is stated as prevention of premature germination of spores (Chitarra et al., 2004). Highly active extracellular siderophores, that are important in conidial germination, were detected in young cultures of *P. chrysogenum* (Charlang et al., 1982). When exposed to solutions at low water



activity, conidia lose a fraction of their cellular siderophores and subsequent germination failed, or was greatly delayed. The inoculum size density was standardized in this study. The important loss of germinability, that was pointed out at  $0.95a_{wge}$  maybe due to the excretion of this self-inhibitor, although no analytical analysis was performed to detect such molecules.

The water activity for germination had a greater influence on germination kinetics than the water activity for sporulation. However, the impact of water activity during sporogenesis was illustrated more clearly at low water activity. At  $0.99a_w$ , conidia obtained at  $0.95a_w$  germinated marginally faster than that at  $0.99a_w$ . In contrast at  $0.95a_w$ , the germination time was greatly shortened for conidia produced at a lower water activity. *Penicillium roqueforti* spores produced at  $0.88a_w$  with either glycerol or NaCl exhibited shorter germination times than those obtained at  $0.99a_w$  by 5.5 and 4 h, respectively (Blaszyk et al., 1998). However, this effect was not shown for *Penicillium aurantiogriseum* and *Penicillium viridicatum*. Recent studies of spoilage fungi such as *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus* have demonstrated that when exposed to osmotic stress, they accumulate significantly elevated amounts of glycerol and sometimes erythritol in their conidia when compared to those present under freely available conditions (Nesci et al., 2004). A lower internal water activity of the former conidia as compared to the latter may be deduced from this observation. It is therefore suggested that the enhancement of the germination of the conidia obtained under osmotic stress may be due to a greater gradient of water across the cell membrane. Some more studies that include monitoring the water activity of the spore during swelling should be carried out to verify this hypothesis.

## 5. Conclusions

In many studies, conidia were obtained by growing mycelium under optimum conditions. But, in real conditions, spores are rather produced under osmotic or other stresses. In order to adapt to these unfavourable conditions, fungi have developed strategies that allowed fast germination of some conidia, while others were self-inhibited. As a result, an increased variability of the germination time and the growth rate of the germ tubes were observed for adapted conidia as compared to non-adapted ones. The differences between the distributions of these two kinds of conidia were more clearly illustrated at low water activities for germination. The adaptation to stress of the organisms is of paramount importance for explaining the observed kinetics. The development of more accurate and also more realistic models would require a better evaluation of the physiological state of organisms. This could be achieved by assessing either changes in gene expression or intracellular composition with the environmental conditions. The real challenge for the future will be how to integrate mathematically all this knowledge into stochastic or probabilistic models.

## Acknowledgement

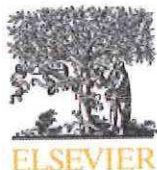
Dr. Marco Beyer is gratefully acknowledged for helpful criticism of the manuscript.

## References

- Araujo, R., Gonçalves Rodrigues, A., 2004. Variability of germinative potential among pathogenic species of *Aspergillus*. J. Clin. Microbiol. 42, 4335–4337.
- Barrios-González, J., Martínez, C., Aguilera, A., Raimbault, M., 1989. Germination of concentrated suspensions of spores from *Aspergillus niger*. Biotechnol. Lett. 11, 551–554.
- Blaszyk, M., Blank, G., Holley, R., Chong, J., 1998. Reduced water activity during sporogenesis in selected penicillia: impact on spore quality. Food Res. Int. 31, 503–509.
- Charlang, G., Horowitz, R.M., Lowy, P.H., Ng, B., Poling, S.M., Horowitz, N.H., 1982. Extracellular siderophores of rapidly growing *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum*. J. Bacteriol. 150, 785–787.
- Charlang, G.V., Horowitz, N.H., 1971. Germination and growth of *Neurospora* at low water activities. Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 260–262.
- Chitarra, G.S., Abee, T., Rombouts, F.M., Posthumus, M.A., Dijksterhuis, J., 2004. Germination of *Penicillium paneum* conidia is regulated by 1-octen-3-ol, a volatile self-inhibitor. Appl. Environ. Microbiol. 70, 2823–2829.
- Dantigny, P., Soares Mansur, C., Sautour, M., Tchobanov, I., Bensoussan, M., 2002. Relationship between spore germination kinetics and lag time during growth of *Mucor racemosus*. Lett. Appl. Microbiol. 35, 395–398.
- Dantigny, P., Guilmar, A., Bensoussan, M., 2003. Predictive mycology: some definitions. Cryptogamie, Mycologie 24, 377–383.
- Dantigny, P., Guilmar, A., Bensoussan, M., 2005. Basis of predictive mycology. Int. J. Food Microbiol. 100, 187–196.
- Dantigny, P., Bensoussan, M., Vasseur, V., Lebrihi, A., Buchet, C., Ismaili-Alaoui, M., Devlieghere, F., Roussos, S., 2006. Standardisation of methods for assessing mould germination: a workshop report. Int. J. Food Microbiol. 108, 286–291.
- Dantigny, P., Marín, S., Beyer, M., Magan, N., 2007. Mould germination: Data treatment and modelling. Int. J. Food Microbiol. 114, 17–24.
- Gervais, P., Fasel, J.-P., Molin, P., 1988. Water relations of spore germination. Appl. Microbiol. Biotechnol. 29, 586–592.
- González, H.H.L., Resnik, S.L., Vaamonde, G., 1987. Influence of inoculum size on growth rate and lag phase of fungi isolated from Argentine corn. Int. J. Food Microbiol. 4, 111–117.
- Heintzeler, I., 1939. Das Wachstum der Schimmelpilze in Abhängigkeit von der Hydraturverhältnissen unter verschiedenen Aussenbedingungen. Arch. Mikrobiol. 10, 92–132.
- Hobot, J.E., Gull, K., 1980. The identification of a self-inhibitor from *Syncephalastrium racemosum* and its effect upon sporangiospores germination. Antonie Leeuwenhoek 46, 435–441.
- Kawanabe, Y., 1986. Responsiveness of *Neurospora crassa* conidia to auxin and gibberellin in relation to culture age. Agric. Biol. Chem. 50, 757–758.
- Marín, S., Sanchis, V., Teixido, A., Saenz, R., Ramos, A.J., Vinas, I., Magan, N., 1996. Water and temperature relations and microconidial germination of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from maize. Can. J. Microbiol. 42, 1045–1050.
- Nesci, A., Etcheverry, M., Magan, N., 2004. Osmotic and matrix potential effects on growth, sugar alcohol and sugar accumulation by *Aspergillus* section *Flavi* strains from Argentina. J. Appl. Microbiol. 96, 965–972.
- Pascual, S., 1998. Studies on production and ecophysiology of fungal antagonists for improved biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and *Monilia laxa*. Ph.D. Thesis. Institute of BioSciences and Technology, Cranfield University, UK.
- Ryan, F.J., 1948. The germination of conidia from biochemical mutants of *Neurospora*. Am. J. Bot. 35, 497–503.
- Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Debevere, J., 2006. Growth kinetics of cultures from single spores of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* on yellow dent corn meal. Food Microbiol. 24, 336–345.
- Sautour, M., Rouget, A., Dantigny, P., Divies, C., Bensoussan, M., 2001a. Prediction of conidial germination of *Penicillium chrysogenum* as influenced by temperature, water activity and pH. Lett. Appl. Microbiol. 32, 131–134.
- Sautour, M., Rouget, A., Dantigny, P., Divies, C., Bensoussan, M., 2001b. Application of Doehlert design to determine the combined effects of temperature, water activity and pH on conidial germination of *Penicillium chrysogenum*. J. Appl. Microbiol. 91, 1–7.
- Snow, D., 1949. The germination of mould spores at controlled humidities. Appl. Biol. 36, 1–13.
- Tomkins, R.G., 1929. Studies of the growth of molds. I. Proc. R. Soc. London B 105, 375–401.
- Trinci, A.P.J., 1971a. Influence of the width of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media. J. Gen. Microbiol. 67, 325–344.
- Trinci, A.P.J., 1971b. Exponential growth of the germ tubes of fungal spores. J. Gen. Microbiol. 67, 345–348.

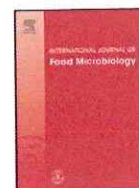
## **ANNEXE 2**





Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Food Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)

## A new model for germination of fungi

Philippe Dantigny<sup>a,\*</sup>, Sidjè Paule-Marina Nanguy<sup>a</sup>, Daniela Judet-Correia<sup>b</sup>, Maurice Bensoussan<sup>c</sup><sup>a</sup> Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires, Agro-Sup Dijon, Université de Bourgogne, France<sup>b</sup> Laboratoire Eau, Molécules Actives, Macromolécules, Activité, Agro-Sup Dijon, Université de Bourgogne, France<sup>c</sup> GTR Mycologie, Sécurité Microbiologique Alimentaire et Environnement, Agro-Sup Dijon, Université de Bourgogne, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 19 November 2010

Received in revised form 13 January 2011

Accepted 18 February 2011

## Keywords:

Model

Germination

Fungi

Mold

Predictive mycology

## ABSTRACT

The objective of this study was to design a germination model dedicated to fungi. The percentage of germinated spores,  $P(\%)$ , depended on the maximum percentage of germination  $P_{\max}(\%)$ , the germination

time,  $\tau$  (h) and a design parameter,  $d$  (-) according to:  $P = P_{\max} \left[ 1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{t}{\tau}\right)^d} \right]$ . The model was capable to fit

satisfactorily either apparent symmetric and asymmetric shapes of germination curves. The accuracy of  $\tau$  determined by using the logistic or the present model was at least twice that obtained by the Gompertz equation. In contrast to the logistic model, the new model is by essence asymmetric. Therefore, its use is consistent with skewed distributions of the individual germination times that were observed experimentally in many cases.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

For fungi germination can be considered as the main step to focus on, because a product is spoiled as soon as visible hyphae can be observed (Dantigny et al., 2005a). A spore is considered to have germinated when the length of the longest germ tube is greater than or equal to the greatest dimension of the swollen spore (Dantigny et al., 2006). But since spores do not germinate at the same time, the distribution of the germination time among a population of spores should be considered. From the cumulative frequency distributions, germination curves can be drawn (Nguyen et al., 2010). The shape of the germination curves, percentage of germinated spores versus time, would therefore depend on these distributions. Right skewed distributions were observed experimentally, thus leading to asymmetric germination curves (Judet et al., 2008).

Many mycologists agreed to define the germination time,  $t_g$  (h), of a population of spores as the time required to obtain a percentage of germinated spores equal to 50% of the viable spores (Huang et al., 2001). Even assuming that the maximum percentage of viable spores equals 100%, the probability of examining the population of spores when exactly 50% of the spores had germinated is close to zero. Therefore the percentage of germinated spores,  $P(\%)$ , is plotted against time and kinetic models are used to estimate  $t_g$ .

Models were developed for the germination of fungi (Bosch et al., 1995; Gervais et al., 1988), but two models are widely used in predictive mycology. The Gompertz and the logistic equation that were used originally to fit the growth of bacteria (Zwietering et al., 1991) and to determine the time of growth and toxin production by *Clostridium botulinum* (Whiting and Call, 1993), respectively. Later the Gompertz and the logistic equations were used to fit the germination data of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* (Marín et al., 1996) and *Mucor racemosus* (Dantigny et al., 2002), respectively.

Both models were tested against many data sets available in the literature (Dantigny et al., 2007). Based on RMSE values, it was impossible to determine which one of the models performed better than the other one. The Gompertz model is asymmetrical but the germination time cannot be determined directly thus leading to inaccuracy of this parameter, in addition to erroneous determination of the maximum percentage of germinated spores,  $P_{\max}(\%)$ , in some cases. In contrast, the logistic equation provided accurate estimations of  $P_{\max}$  and  $t_g$ , but concerns were raised because attempting to fit the symmetrical logistic function to actual asymmetrical data sets seemed inappropriate.

Therefore the objective of the present study was to design an asymmetric model based on the maximum percentage of germination and the germination time. Firstly, the characteristics of the asymmetric model were detailed. Secondly, the asymmetric model was tested against the Gompertz and the logistic equations on germination data that exhibited significant overestimates of  $P_{\max}$  (Dantigny et al., 2005b) and skewed distributions of the individual germination times (Judet et al., 2008). Thirdly, the asymmetric model was fit to the germination data obtained from the literature for different species.

\* Corresponding author at: Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires, Agro-Sup Dijon, 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France. Tel.: +33 3 80 77 40 71.

E-mail address: [phdant@u-bourgogne.fr](mailto:phdant@u-bourgogne.fr) (P. Dantigny).



2. Material and methods

2.1. Logistic model

The logistic function is:

$$P = \frac{P_{max}}{1 + \exp[k(\tau - t)]} \tag{1}$$

where  $P_{max}$  (%) is the asymptotic P value at  $t \rightarrow +\infty$ ,  $\tau$  (h) is the inflection point where P equals half of the  $P_{max}$ , t is the time (h) and k ( $h^{-1}$ ) is related to the slope of the tangent line through the inflection point. The slope of the tangent line at  $\tau$ , is equal to  $k \cdot P_{max}/4$  (Dantigny et al., 2007). The germination time  $t_g$  is equal to  $\tau$ .

2.2. Gompertz model

The modified Gompertz equation is:

$$P = A \cdot \exp\left(-\exp\left[\frac{\mu_m \cdot e(1)}{A}(\delta - t) + 1\right]\right) \tag{2}$$

where A (%) is the asymptotic P value at  $t \rightarrow +\infty$ ,  $\mu_m$  ( $\%h^{-1}$ ) is the slope term of the tangent line through the inflection point ( $t_i$ ) as defined further,  $\delta$  (h) is the t-axis intercept of the tangent through the inflection point and t is the time (h).

The inflection point is  $t_i = \delta + A/(\mu_m \cdot e(1))$  (Dantigny et al., 2003).

The germination time  $t_g$  (h) can be determined for  $P=A/2$  as follows:

$$\exp\left(-\exp\left[\frac{\mu_m \cdot e(1)}{A}(\delta - t_g) + 1\right]\right) = 0.5 \tag{3}$$

$$\left(-\exp\left[\frac{\mu_m \cdot e(1)}{A}(\delta - t_g) + 1\right]\right) = \ln(0.5) \tag{4}$$

$$\left[\frac{\mu_m \cdot e(1)}{A}(\delta - t_g)\right] = \ln(-\ln(0.5)) - 1 \tag{5}$$

$$(\delta - t_g) = \frac{[\ln(-\ln(0.5)) - 1]A}{\mu_m \cdot e(1)} \tag{6}$$

Eventually,

$$t_g = \delta - \frac{[\ln(-\ln(0.5)) - 1]A}{\mu_m \cdot e(1)} \tag{7}$$

The relative accuracy of  $t_g$  can also be deduced from Eq. (6) using the differential form of the logarithm.

$$\frac{d(\delta - t_g)}{(\delta - t_g)} = \frac{d(\ln(-\ln(0.5)) - 1)}{\ln(-\ln(0.5)) - 1} + \frac{dA}{A} - \frac{d\mu_m}{\mu_m} - \frac{de(1)}{e(1)} \tag{8}$$

The constant terms can be omitted, then:

$$\frac{d\delta}{(\delta - t_g)} - \frac{dt_g}{(\delta - t_g)} = \frac{dA}{A} - \frac{d\mu_m}{\mu_m} \tag{9}$$

$$\frac{dt_g}{t_g} = \left[ \frac{d\delta}{(\delta - t_g)} - \frac{dA}{A} + \frac{d\mu_m}{\mu_m} \right] \frac{(\delta - t_g)}{t_g} \tag{10}$$

Eventually,

$$\frac{\Delta t_g}{t_g} = \left[ \frac{\Delta\delta}{(\delta - t_g)} + \frac{\Delta A}{A} + \frac{\Delta\mu_m}{\mu_m} \right] \frac{(\delta - t_g)}{t_g} \tag{11}$$

By comparison, for the logistic model and the asymmetric model (see below),  $\frac{\Delta t_g}{t_g} = \frac{\Delta\tau}{\tau}$ .

2.3. Asymmetric model

The asymmetric model:

$$P = P_{max} \left[ 1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{t}{\tau}\right)^d} \right] \tag{12}$$

is derived from the non competitive inhibition model described by Yano and Koya (1973).  $P_{max}$  is the asymptotic P value at  $t \rightarrow +\infty$ ,  $\tau$ (h) the point where P equals half of the  $P_{max}$ . The germination time  $t_g$  is equal to  $\tau$ . The different shapes of the curves for different values of the design parameter  $d > 0$  are shown in Fig. 1. For  $d = 1$  the shape of the curve differed from the S-shaped germination curve. For  $d = 2$ , the percentage of germinated spores increases shortly after the origin. This is contradictory to the observation of a swelling period before the germinating tube can be formed and the spore germinated. Therefore, in practice the asymmetric model is a candidate for fitting the germination data for d values greater than 2 only.

It is shown in Fig. 1, that if the curve is symmetric, symmetry would be observed with respect to the point defined by  $t/\tau = 1$  and  $P/P_{max} = 0.5$ . Assuming  $0 \leq x = t/\tau < 1$ .

For x, the percentage of germinated spores is:

$$\frac{P_x}{P_{max}} = 1 - \frac{1}{1 + x^d} \tag{13}$$

With respect to  $x = 1$ , the symmetric of x is  $(2 - x)$ .

For  $(2 - x)$ , the percentage of germinated spore is:

$$\frac{P_{2-x}}{P_{max}} = 1 - \frac{1}{1 + (2-x)^d} \tag{14}$$

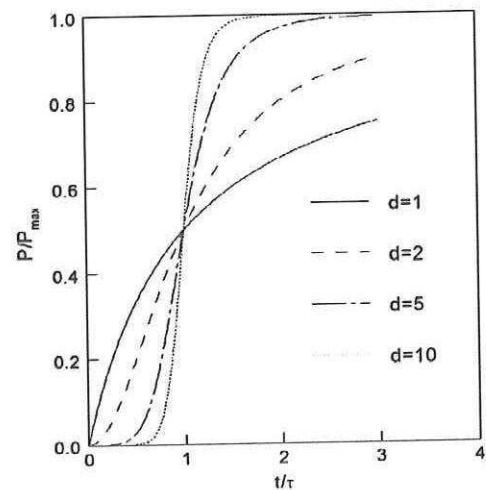


Fig. 1. Effect of the design parameter d on the shape of the asymmetric model.

**Table 1**

Estimates of the percentage of viable conidia of *Penicillium chrysogenum* exposed to vapors generated by 2.5% (v/v) ethanol (data from Dantigny et al., 2005b) determined by three germination models for three replicates (runs 1 to 3).

Run	Model					
	Logistic		Gompertz		Asymmetric	
	$P_{\max}$ (%)	t-value	A (%)	t-value	$P_{\max}$ (%)	t-value
1	98.2 [91.2; 105.2] <sup>*</sup>	34.3	105.2 [98.8; 111.5]	40.5	100.9 [93.6; 108.1]	33.9
2	99.0 [90.5; 107.4]	28.8	107.7 [95.1; 120.3]	20.9	102.2 [92.4; 112.0]	25.4
3	100.5 [94.1; 106.8]	38.8	108.2 [101.1; 115.3]	37.3	103.3 [96.6; 110.1]	37.4

\* 95% confidence intervals in brackets.

If the model is symmetric, it should be demonstrated that

$$\frac{P_x}{P_{\max}} + \frac{P_{2-x}}{P_{\max}} = \left[1 - \frac{1}{1+x^d}\right] + \left[1 - \frac{1}{1+(2-x)^d}\right] = 1 \quad (15)$$

$$1 = \frac{1}{1+x^d} + \frac{1}{1+(2-x)^d} \quad (16)$$

$$1 = \frac{(1+x^d) + (1+(2-x)^d)}{(1+x^d)(1+(2-x)^d)} \quad (17)$$

Developing and simplifying,

$$[(2-x)x]^d = 1. \quad (18)$$

The equation has no solution because  $x$  differed from 1, therefore the model is asymmetric.

#### 2.4. Data sets

The raw germination data, percentage germination  $P$  (%) versus time  $t$  (h), were obtained for *Aspergillus carbonarius* (Mitchell, 2006), *Aspergillus ochraceus* (Pardo et al., 2004), *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* (Marín et al., 1996), *Gibberella zeae* (Beyer et al., 2005), *M. racemosus* (Dantigny et al., 2002), *Penicillium chrysogenum* (Dantigny et al., 2005b; Judet et al., 2008) and *Penicillium verrucosum* (Pardo et al., 2006).

#### 2.5. Model fitting

Non linear regressions were performed by using SlideWrite 5.0 (Advanced Graphics Software, Inc., Carlsbad, CA, USA). This software was based upon the Levenberg–Marquardt Algorithm. The goodness of fit was evaluated by means of the root mean square error, RMSE, (Ratkowsky, 2004) and extracted from ANOVA tables.

**Table 2**

Estimates of the germination time of *Penicillium chrysogenum* (data from Judet et al., 2008) determined by three germination models for different distributions of the individual germination times and estimates of the design parameter for the asymmetric model.

Distribution of individual germination times	Model						
	Logistic		Gompertz		Asymmetric		
	$\tau$ (h)	RMSE	$t_g$ (h)	RMSE	$\tau$ (h)	RMSE	$d$ (-)
Skewed (a)	33.5 [33.1; 33.9] <sup>*</sup>	1.691	33.4 [32.5; 34.3]	1.055	33.5 [33.1; 33.9]	1.451	13.7 [11.9; 15.6]
Un-skewed (b)	44.8 [44.5; 45.1]	1.257	44.4 [43.6; 45.2]	1.037	44.9 [44.6; 45.1]	1.074	15.7 [14.5; 16.9]
Un-skewed (c)	8.73 [8.66; 8.80]	0.771	8.94 [8.46; 9.42]	1.323	8.72 [8.71; 8.73]	0.100	17.3 [17.0; 17.5]
Skewed (d)	10.6 [10.5; 10.7]	1.741	10.6 [10.3; 10.9]	2.181	10.6 [10.5; 10.7]	1.474	20.7 [17.4; 24.1]

(a)  $S = 0.987$ ,  $p < 0.001$ ; (b)  $S = 0.298$ ,  $p = 0.306$ ; (c)  $S = 0.426$ ,  $p = 0.131$ ; (d)  $S = 0.585$ ,  $p = 0.026$ .  $S$ : skewness.

\* 95% confidence intervals in brackets.

### 3. Results

#### 3.1. Estimation of the percentage of viable spores

The estimates of the percentage of viable spores are reported for three replicates (run 1 to 3) assessing the effect of ethanol vapors generated by 2.5% (v/v) solutions on the germination of *P. chrysogenum*, Table 1. An overestimation of  $P_{\max}$  was shown for the Gompertz and the asymmetric models for runs 1 and 2, but the 100% value remained within the 95% confidence intervals. A clear overestimation of  $P_{\max}$  was demonstrated for the Gompertz model for run 3. In contrast, the asymmetric model did not provide any erroneous value for  $P_{\max}$ . It was also shown that the confidence interval for the asymmetric model was not wider than that for the Gompertz model as demonstrated by almost identical t-values, Table 1. Therefore the fact that  $P_{\max}$  did not differ significantly from 100% with the asymmetric model was not due to a wider confidence interval than that calculated for the Gompertz model. For all the other data sets tested in the present study, no significant overestimation of  $P_{\max}$  was noticed for any of the three models (data not shown).

#### 3.2. Accuracy of the models

Based on RMSE values, it was shown that the asymmetric model performed better than the logistic one, for fitting the germination curves obtained from skewed distributions, experiments (a) and (d), Table 2. However, the Gompertz and the asymmetric model exhibited the lowest RMSE value for experiment (a) and (d), respectively. Surprisingly, the logistic model did not perform better than the two other models for fitting germination curves obtained from un-skewed distributions, experiments (b) and (c). For the other data sets tested in the present study, the logistic, the Gompertz and the asymmetric model performed better in 14, 12 and 8 cases, respectively (Table 3). When the asymmetric model did not perform better, it was ranked second in 22 cases out of 26, third in only 4 cases.

#### 3.3. Estimation of the germination time

For experiments (b) and (c), the germination times obtained with the logistic and the asymmetric models differed, almost non-



**Table 3**

Determination of RMSE values for different set of germination data taken from the literature adjusted to the models. *Aspergillus carbonarius* (Mitchell, 2006), *A. ochraceus* (Pardo et al., 2004), *Fusarium proliferatum* (Marín et al., 1996), *Gibberella zeae* (Beyer et al., 2005), *Mucor racemosus* (Dantigny et al., 2002), *Penicillium verrucosum* (Pardo et al., 2006).

Fungus	<i>Aspergillus carbonarius</i>						
Factor	Water activity/Temperature (°C)	0.90/25	0.90/30	0.90/35	0.90/40	0.93/25	
Model	Logistic/Gompertz/Asymmetric	4.457/ <b>4.005</b> /4.235	<b>3.680</b> /3.919/3.729	4.660/ <b>4.170</b> /4.243	6.927/8.583/ <b>6.888</b>	<b>4.026</b> /5.092/4.840	
Factor	Water activity/Temperature (°C)	0.95/15	0.95/20	0.95/25	0.95/30	0.95/35	0.95/40
Model	Logistic/Gompertz/Asymmetric	5.015/ <b>4.559</b> /4.678	6.065/ <b>5.302</b> /5.466	<b>4.405</b> /4.909/4.810	3.955/4.105/ <b>3.793</b>	<b>6.192</b> /7.697/8.122	<b>8.433</b> / <b>8.252</b> /8.436
Factor	Water activity/Temperature (°C)	0.987/15	0.987/20	0.987/25	0.987/30	0.987/40	
Model	Logistic/Gompertz/Asymmetric	9.485/ <b>8.254</b> /8.292	8.034/6.554/ <b>6.064</b>	<b>6.249</b> /6.762/7.128	8.335/ <b>8.322</b> /8.642	<b>4.636</b> /5.661/5.043	
Fungus	<i>Aspergillus ochraceus</i>						
Factor	Water activity	0.85	0.90	0.95	0.99		
Model	Logistic/Gompertz/Asymmetric	5.765/ <b>5.312</b> /5.424	4.952/4.855/ <b>4.834</b>	<b>5.140</b> /5.921/5.288	4.816/3.530/ <b>2.858</b>		
Fungus	<i>Fusarium proliferatum</i>						
Factor	Water activity	0.88	0.90	0.92	0.94	0.96	0.98
Model	Logistic/Gompertz/Asymmetric	<b>4.157</b> /4.944/4.508	<b>4.933</b> /5.255/5.038	<b>6.506</b> /7.477/6.843	<b>4.908</b> /5.791/5.236	<b>4.280</b> / <b>3.658</b> /3.824	<b>2.158</b> /2.378/ <b>2.095</b>
Fungus	<i>Gibberella zeae</i>						
Factor	Kind of spores	Macroconidia	Ascospores				
Model	Logistic/Gompertz/Asymmetric	6.071/ <b>5.707</b> /5.764	6.567/ <b>5.867</b> /6.076				
Fungus	<i>Mucor racemosus</i>						
Factor	Temperature (°C)	15	25				
Model	Logistic/Gompertz/Asymmetric	7.463/7.453/ <b>7.404</b>	<b>8.098</b> /8.592/8.134				
Fungus	<i>Penicillium verrucosum</i>						
Factor	Water activity	0.85	0.90	0.95	0.99		
Model	Logistic/Gompertz/Asymmetric	14.73/28.54/ <b>14.59</b>	6.638/ <b>6.107</b> /6.298	<b>6.290</b> /7.483/6.696	<b>3.604</b> /5.167/3.856		

Bold values indicated the best goodness of fit.

significantly, from that estimated with the Gompertz model, Table 2. For these experiments, the difference between the estimated germination differed from less than 0.1 h between the logistic and the asymmetric model. For experiments (a) and (d), no difference was shown between the estimates obtained by these models. The difference between the germination time obtained by the Gompertz model was not significantly different (ca. less than 0.1 h). In contrast, the confidence intervals for the germination time obtained by the Gompertz model were more than 2 fold, up to 6.9 fold for experiment (c), those obtained by the other models.

### 3.4. Estimation of the design parameter

The values of the design parameter  $d$  were significantly less for the experiments (a) and (b), than those obtained for the other experiments, Table 2. The smaller values of  $d$  (13.7 and 15.7) were obtained for shallow slopes of the germination curves, Fig. 2. The greatest values of  $d$  (17.3 and 20.7) were obtained for steeper slopes. In the

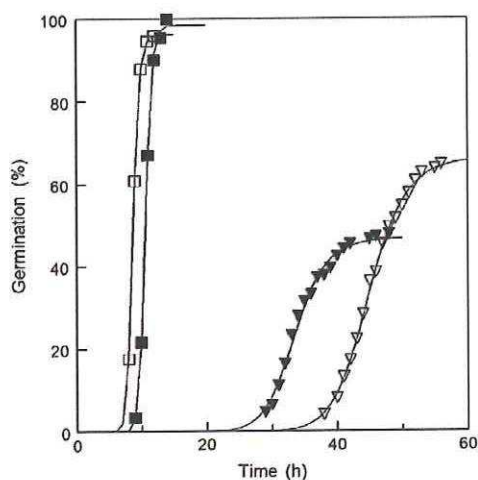


Fig. 2. Germination curves obtained for *Penicillium chrysogenum* by the asymmetric model, (■, ▼) skewed distributions and (□, ▽) un-skewed distribution. Data from Judet et al. (2008).

latter conditions, a visual inspection cannot determine whether the germination curves were symmetrical or not.

For the data set obtained for *F. verticillioides*, the values of  $d$  were significantly less, in the range 4.27–6.26, Table 4. The values of  $d$  did not depend on the water activity, whereas the slopes of the germination curves were clearly steeper at higher  $a_w$ , Fig. 3. The effect of  $d$  on the shape of the germination curves was shown in a dimensionless form, (i.e., independent from the value of  $\tau$ ), Fig. 1. Therefore the effect of  $d$  of the shape of the germination curves cannot be compared on Fig. 3, because the germination time depended on the water activity. However, for the same germination time and also the same percentage of viable spores, the slope of the curve increased with increasing the value of  $d$ . For example, the slope of the germination curve obtained for *P. chrysogenum* (experiment c) was greater than that of *F. verticillioides* (0.96  $a_w$ ). Although, this cannot be seen because the time-scales were different in Figs. 2 and 3.

The values of the design parameter depended on the experimental conditions. A value of  $d$  as low as 2.75 was obtained for *A. carbonarius* at 0.987  $a_w$ /30 °C (Table 5). But, for this species, a value of  $d = 16.3$  was obtained at 0.90  $a_w$ /40 °C. There was no clear relationship between the environmental conditions and the value of the design parameter. However, for *P. verrucosum*, a trend in an increase of  $d$  with increasing  $a_w$  was noticeable. The values of  $d$  depended also on the fungi. Some species such as *F. proliferatum* and *G. zeae* exhibited  $d$ -values less than 10. This was also the case for *A. carbonarius* in 9 cases out of 16, Table 5. In contrast, *Mucor racemosus* was characterized by  $d$ -values greater than 10.

**Table 4**

Parameter estimates obtained by fitting the germination data of *Fusarium verticillioides* (Marín et al., 1996) to the asymmetric model.

Experimental conditions	Parameter estimates			
	$P_{max}$ (%)	$\tau$ (h)	$d$ (-)	RMSE
0.88 $a_w$	97.6 [86.9; 108.3]*	121 [110; 131]	4.27 [2.79; 5.76]	7.235
0.90 $a_w$	107 [98.4; 116]	54.3 [51.5; 57.1]	4.71 [3.76; 5.65]	3.842
0.92 $a_w$	105 [96.5; 114]	26.3 [24.7; 28.0]	4.46 [3.80; 5.12]	3.223
0.94 $a_w$	110 [96.7; 123]	13.3 [12.5; 14.0]	6.26 [4.83; 7.69]	4.535
0.96 $a_w$	114 [91.1; 138]	8.58 [7.82; 9.34]	6.00 [4.22; 7.78]	5.046
0.98 $a_w$	116 [94.6; 138]	6.64 [6.04; 7.23]	5.69 [4.08; 7.30]	5.128

\* 95% confidence intervals in brackets.



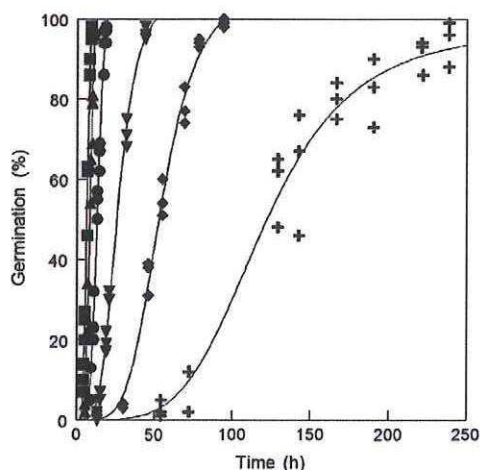


Fig. 3. Germination curves obtained for *Fusarium verticillioides* by the asymmetric model (■) 0.98  $a_w$ , (▲) 0.96  $a_w$ , (●) 0.94  $a_w$ , (▼) 0.92  $a_w$ , (◆) 0.90  $a_w$ , (+) 0.88  $a_w$ . Data from Marín et al. (1996).

4. Discussion

The goodness of fit of a model is often evaluated by the coefficient of determination or more accurately by the root mean square error, RMSE, for non-linear models (Ratkowsky, 2004). In order to determine which model fitted germination data sets better, two models (i.e., Gompertz and logistic) were compared previously (Dantigny et al., 2007). Based on RMSE values, it was impossible to determine which model performed better, because this depended on the fungi and the experimental conditions. This was also observed in the present study when comparing the RMSE values obtained by fitting the asymmetric and the two other models to data taken from the literature.

It should be reminded that one of the major roles of a model is to provide accurate estimations of a parameter that cannot be determined easily. These parameters are usually of some biological significance (i.e., growth rate, lag time, germination time, minimum inhibitory concentration, cardinal values for temperature and water activity, d-values, ...). All these parameters are also characterized by definitions widely admitted by the scientific community. The

definition of the germination time varied greatly, depending on the objective. For the production of starters or metabolites, a typical value was 90% but in food mycology the value was usually 10% (Magan and Lacey, 1984). A germination time based on a given percentage of inoculated spores depends on the value of the three parameters whatever the model. For example, the time at which 10% of the inoculated spores had germinated is  $t_{10\%} = \frac{\tau - \ln(\frac{P_{10}}{P_{max}} - 1)}{k}$  with the logistic model. Whatever the percentage of germination, 10%, 50% or 90%, all models would provide inaccurate estimations of the germination time because none of the model had been designed for determining this parameter.

It is better to base the definition of the germination time on a certain percentage of the viable spores, not the inoculated spores. A practical interest of the definition is whatever the percentage of viable spores, the germination time can be determined. For example, if the germination time is defined as the time required to have 50% of the inoculated spores, this time cannot be determined if the percentage of viable spores is 40% only. In contrast, 50% of the viable spores is synonymous to 20% of the inoculated spores. During the last workshop dedicated to germination, it was recommended to define the germination time of a population of spores as the time required to have 50% of the viable spores germinated (Huang et al., 2001; Dantigny et al., 2006). Among the viable spores, 50% was a good trade-off between 10 and 90%. It was demonstrated in the present study that a more accurate determination of the germination time was obtained when the model (i.e., logistic and asymmetric models) was designed for providing this parameter. It was also shown that the estimation of the germination time did not depend on the model. Therefore there is no penalty in using the asymmetric model for future studies because the germination time can be compared to values determined in previous studies by the other models.

The percentage of viable spores is also an important parameter for assessing germination. In the present study,  $P_{max}$  values greater than 100% (although not significant) were obtained by fitting the asymmetric model to germination data of *F. verticillioides*. This effect was also observed with the Gompertz model. It was partly due to the sampled data. Whereas all spores were probably viable, as suggested by the estimates of the maximum percentage of germination, the last recorded values of P were less than 100%. The overestimation can be corrected by collecting data until 100% germination or by setting the maximum percentage of germination to 100% (Marín et al., 1996).

Table 5

Estimation of the design parameter d for different set of germination data taken from the literature. *Aspergillus carbonarius* (Mitchell, 2006), *A. ochraceus* (Pardo et al., 2004), *Fusarium proliferatum* (Marín et al., 1996), *Gibberella zeae* (Beyer et al., 2005), *Mucor racemosus* (Dantigny et al., 2002), *Penicillium verrucosum* (Pardo et al., 2006).

Fungus	<i>Aspergillus carbonarius</i>						
Factor	$a_w$ /Temperature (°C)	0.90/25	0.90/30	0.90/35	0.90/40	0.93/25	
d	Estimate [95% CI]	6.50 <sup>ac</sup> [5.16;7.85]	5.74 <sup>ac</sup> [4.92;6.57]	7.66 <sup>a</sup> [6.28;9.03]	16.3 <sup>b</sup> [9.24;23.4]	4.83 <sup>c</sup> [3.91;5.75]	
Factor	$a_w$ /Temperature (°C)	0.95/15	0.95/20	0.95/25	0.95/30	0.95/35	
d	Estimate [95% CI]	4.66 <sup>acd</sup> [3.72;5.60]	4.60 <sup>acd</sup> [3.55;5.66]	11.7 <sup>ab</sup> [8.13;15.2]	6.19 <sup>ac</sup> [5.16;7.23]	3.29 <sup>cd</sup> [2.12;4.47]	2.94 <sup>d</sup> [2.10;3.80]
Factor	$a_w$ /Temperature (°C)	0.987/15	0.987/20	0.987/25	0.987/30	0.987/40	
d	Estimate [95% CI]	3.39 <sup>cd</sup> [2.02;4.77]	3.17 <sup>d</sup> [2.48;3.86]	3.59 <sup>cd</sup> [2.74;4.44]	2.75 <sup>d</sup> [1.97;3.53]	7.00 <sup>ac</sup> [5.67;8.32]	
Fungus	<i>Aspergillus ochraceus</i>						
Factor	Water activity	0.85	0.90	0.95	0.99		
d	Estimate [95% CI]	9.46 <sup>a</sup> [8.09;10.8]	18.5 <sup>b</sup> [15.5;21.5]	10.8 <sup>a</sup> [8.66;12.9]	10.6 <sup>a</sup> [9.22;12.0]		
Fungus	<i>Fusarium proliferatum</i>						
Factor	Water activity	0.88	0.90	0.92	0.94	0.96	
d	Estimate [95% CI]	6.57 <sup>ab</sup> [5.25;7.89]	6.13 <sup>ab</sup> [4.53;7.74]	9.25 <sup>b</sup> [6.76;11.7]	8.47 <sup>b</sup> [6.43;10.5]	5.30 <sup>a</sup> [4.25;6.35]	7.00 <sup>bb</sup> [6.33;7.67]
Fungus	<i>Gibberella zeae</i>						
Factor	Kind of spores	Macroconidia	Ascospores				
d	Estimate [95% CI]	7.10 <sup>a</sup> [6.10; 8.11]	7.80 <sup>a</sup> [6.25; 9.35]				
Fungus	<i>Mucor racemosus</i>						
Factor	Temperature (°C)	15	25				
d	Estimate [95% CI]	22.2 <sup>a</sup> [14.5;29.8]	31.1 <sup>a</sup> [22.6;39.6]				
Fungus	<i>Penicillium verrucosum</i>						
Factor	Water activity	0.85	0.90	0.95	0.99		
d	Estimate [95% CI]	5.05 <sup>a</sup> [1.49; 8.60]	5.70 <sup>a</sup> [3.25;8.15]	11.7 <sup>ab</sup> [7.36;16.1]	15.3 <sup>b</sup> [12.9;17.7]		

Different letters for the same species denoted significant differences in the value of d.



Another important but neglected quality of a model is the consistency with the observed experimental responses and the underlying mechanisms of development of the organisms. It was demonstrated that germination curves exhibited different shapes, apparently symmetric or clearly asymmetric. It was already noted for bacteria that attempting to fit the symmetrical logistic function to actual asymmetrical data sets seemed inappropriate (Skinner et al., 1994). The main advantage of the asymmetric model was its versatility. The capability of this model to adjust satisfactorily symmetric and asymmetric shapes of germination curves was highlighted in the present study. This versatility was obtained through the design parameter  $d$ . Depending on the species and the environmental conditions, the values of  $d$  varied in the range 3–30. The lowest and the greatest values of  $d$  were obtained for *A. carbonarius* and *M. racemosus* respectively. Regardless of the germination time, the germination curves appeared steeper and more symmetric as the values of  $d$  increased.

Lastly but not least, the facility of convergence is an important criterion for using a model. The convergence is usually ensured if the initial values of the parameters are close to the final estimates (Zwietering, personal communication). The asymmetric model can be used easily by mycologists because it is based on biological parameters. The initial values of the maximum percentage of germination,  $P_{\max}$  and the germination time,  $\tau$  can be evaluated by a rough inspection of the data. The design parameter depended on the environmental conditions and on the species. But by using the initial value  $d=10$ , the non-linear regression software used in the present study did not fail to converge.

## 5. Conclusions

In predictive mycology, all the existing models were previously used for bacteria, although not necessarily for the same purpose. Up to our knowledge, this study described the first model dedicated to the germination of fungi. The asymmetric model was based on the definition of the germination time widely accepted by food mycologists and also plant pathologists. The versatility of the model was obtained by the use of a design parameter. For values in the range 3–30, the asymmetric model fitted many germination data sets described in the literature satisfactorily. It was shown that other interesting shapes can be obtained for values of  $d$  less than or equal to 2. Therefore, in the present study, only one example of the potential applications of the equation was shown. There are many possibilities that the equation can be used, maybe after some transformations, to model inhibition or inactivation kinetics observed not only in fungi but also in bacteria or other organisms.

## References

- Beyer, M., Verreet, J.-A., Ragab, W.S.M., 2005. Effect of relative humidity on germination of ascospores and macroconidia of *Gibberella zeae* and deoxynivalenol production. *International Journal of Food Microbiology* 98, 233–240.
- Bosch, A., Maronna, R.A., Yantorno, O.M., 1995. A simple descriptive model of filamentous fungi spore germination. *Process Biochemistry* 7, 599–606.
- Dantigny, P., Soares Mansur, C., Sautour, M., Tchobanov, I., Bensoussan, M., 2002. Relationship between spore germination kinetics and lag time during growth of *Mucor racemosus*. *Letters in Applied Microbiology* 35, 395–398.
- Dantigny, P., Guilmar, A., Bensoussan, M., 2003. Predictive mycology: some definitions. *Cryptogamie, Mycologie* 24, 377–383.
- Dantigny, P., Guilmar, A., Bensoussan, M., 2005a. Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology* 100, 187–196.
- Dantigny, P., Tchobanov, I., Bensoussan, M., Zwietering, M., 2005b. Modelling the effect of ethanol vapor on the germination time of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Food Protection* 68, 1203–1207.
- Dantigny, P., Bensoussan, M., Vasseur, V., Lebrhi, A., Buchet, C., Ismaili-Alaoui, M., Devlieghere, F., Roussos, S., 2006. Standardisation of methods for assessing mould germination: a workshop report. *International Journal of Food Microbiology* 108, 286–291.
- Dantigny, P., Marin, S., Beyer, M., Magan, N., 2007. Mould germination: data treatment and modelling. *International Journal of Food Microbiology* 114, 17–24.
- Cervais, P., Fasel, J.-P., Molin, P., 1988. Water relations of spore germination. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29, 586–592.
- Huang, Y.J., Toscano-Underwood, C., Fitt, B.D.L., Todd, A.D., West, J.S., Koopmann, B., Balesdent, M.H., 2001. Effects of temperature on germination and hyphal growth from ascospores of A-group and B-group *Leptosphaeria maculans* (phoma stem cancer of oilseed rape). *Annals of Applied Biology* 139, 193–207.
- Judet, D., Bensoussan, M., Perrier-Cornet, J.-M., Dantigny, P., 2008. Distributions of the growth rate of the germ tubes and germination time of *Penicillium chrysogenum* conidia depend on water activity. *Food Microbiology* 25, 902–907.
- Magan, N., Lacey, J., 1984. Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 82, 71–81.
- Marín, S., Sanchis, V., Teixido, A., Saenz, R., Ramos, A.J., Vinas, I., Magan, N., 1996. Water and temperature relations and microconidial germination of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from maize. *Canadian Journal of Microbiology* 42, 1045–1050.
- Mitchell, D., 2006. Ecological factors affect growth and ochratoxin A production by *Aspergillus section Nigri* species on grapes. PhD Thesis, Cranfield University, Silsoe, Bedford, U.K.
- Nguyen, L., Bodirola, D., Kelemen, R., Joo, J., Gwinn, K.D., 2010. Modeling the effects of cymene on the distribution of germination and growth of *Beauveria bassiana*. [http://arxiv.org/PS\\_cache/arxiv/pdf/1010/1010.0919v1.pdf](http://arxiv.org/PS_cache/arxiv/pdf/1010/1010.0919v1.pdf), accessed 11/18/2010.
- Pardo, E., Marín, S., Solsona, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2004. Modelling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. *Food Microbiology* 21, 267–274.
- Pardo, E., Malet, M., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2006. Effects of water activity and temperature on germination and growth profiles of ochratoxigenic *Penicillium verrucosum* isolates on barley meal extract agar. *International Journal of Food Microbiology* 106, 25–31.
- Ratkowsky, D.A., 2004. Model fitting and uncertainty. In: McKellar, R.C., Lu, X. (Eds.), *Modeling Microbial Responses in Food*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 152–196.
- Skinner, G.E., Larkin, J.W., Rhodehamel, E.J., 1994. Mathematical modeling of microbial growth: a review. *Journal of Food Safety* 14, 175–217.
- Whiting, R.C., Call, J.E., 1993. Time of growth model for proteolytic *Clostridium botulinum*. *Food Microbiology* 10, 295–301.
- Yano, T., Koya, S., 1973. Dynamic behaviour of the chemostat subject to product inhibition. *Journal of General Applied Microbiology* 19, 97–114.
- Zwietering, M.H., de Koos, J.T., Hasenack, B.E., van't Riet, K., 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1094–1101.

## **ANNEXE 3**

# Effets du cuivre et de la température sur la croissance de moisissures d'altération de la vigne.

Claudine Charpentier<sup>1</sup>, Daniela Correia-Judet<sup>2</sup>, Brigitte ROUX<sup>2</sup>, Philippe Dantigny<sup>3</sup>, Maurice Bensoussan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Université de Bourgogne-UMR INRA 1131-IUVV-Dijon-France

<sup>2</sup>Université de Bourgogne-GTR MycoSMAE-AgroSup Dijon-France

<sup>3</sup>Université de Bourgogne-GPMA-AgroSup Dijon-Dijon-France

**Publié dans la Revue des œnologues nr. 139**

## 1. Introduction

### 1.1. L'origine biologique de l'odeur de terre.

Des odeurs de terre émanant de certaines eaux ont été décrites depuis longtemps (Medsker *et al.*, 1968 ; Rosen *et al.*, 1970 ; Piet *et al.*, 1972). Ainsi, le lac Ontario, qui est la source d'eau potable de plusieurs millions de consommateurs connaît, dans sa portion nord-ouest, des épisodes pendant lesquels l'eau dégage une odeur terreuse. Ces épisodes surviennent la fin de l'été et en automne, associés à la prolifération de bactéries filamenteuses comme les Actinomycètes (Scholler *et al.*, 2002), lesquelles sont à l'origine de concentrations élevées de géosmine et de 2-méthylisobornéol ayant des niveaux de perception très bas (Gerber, 1977; Ridal *et al.*, 1999).

### 1.2. Le gout moisi-terreux dans les vins

Dans le vin, l'odeur terreuse a été associée à certaines conditions de stockage et de conditionnement, parfois teintées de goût de bouchon (Silva Pereira *et al.*, 2000). Mais, au niveau des raisins, l'odeur de terre a été mise en évidence, dès 1992, dans le Val de Loire sur le cépage *Chenin* et, depuis lors, ce défaut est apparu en 1999 dans le Beaujolais et en Bourgogne et s'est répandu, avec plus ou moins d'intensité, dans plusieurs régions viticoles comme le Bordelais, l'Alsace et le Jura avec un impact sur l'économie du vin en 2002 et en 2004. Ainsi, une diversité de composés responsables ont pu être identifiés (Tableau 1). L'origine fongique des molécules associées au goût moisi-terreux a été démontrée (Darriet *et al.*, 2000), mais, seule la géosmine s'est révélée non dégradée lors de la fermentation alcoolique.

### 1.3. Le cuivre et les traitements antifongiques

L'activité biocide du cuivre est connue depuis longtemps. La recette d'un pesticide (algicide et fongicide) dans lequel l'acidité du sulfate de cuivre est neutralisée par de la chaux éteinte ( $\text{CuSO}_4 + \text{Ca}(\text{OH})_2$ ), date du début des années 1880, mise au point par Ulysse Gayon et Alexis Millardet lors de leur collaboration pour protéger les vignes du « mildiou » (*Plasmopara viticola*) venu d'Amérique. Utilisée en 1885 dans le Bordelais, la « bouillie bordelaise » contient 20% (m/m) de cuivre. Depuis cette date, le cuivre est entré dans la composition de fongicides appartenant à diverses familles chimiques (sulfates, hydroxydes, oxychlorures, ...) et, suite aux traitements préventifs de la vigne, les niveaux de cuivre peuvent atteindre de fortes concentrations dans l'environnement des ceps (Brun *et al.*, 2001). Paradoxalement, cet état favorise la prolifération et la persistance de spores du genre *Penicillium*. Yamamoto *et al.* (1985) ont ainsi montré que le genre *Penicillium* était prédominant dans des sols pollués par le cuivre. Or, il a été démontré que la production de

géosmine par *P. expansum* est stimulée par la présence de cuivre (Dionigi et Ingram, 1994). Des études préliminaires sur milieu modèle, en cultures pures et en co-cultures de *Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum*, ont depuis lors montré que le 2-méthylisobornéol est produit par les moisissures du genre *Botrytis* et que la géosmine est produite, entre autres, par *Penicillium expansum* (Charpentier *et al.*, 2006). Ces deux composés qui dérivent de la voie du mévalonate, sont des terpénoïdes. Ils sont considérés comme des métabolites secondaires, car leur niveau de biosynthèse n'est pas constant et varie selon les effets de facteurs biotiques ou abiotiques conditionnant la croissance des moisissures impliquées. Il est aussi généralement connu que, comme chez tout microorganisme, la température influence les cinétiques de croissance des moisissures (Sautour *et al.*, 2001). De ces constatations, a découlé l'étude des effets de deux facteurs environnementaux (la teneur en sel de cuivre et la température de l'ambiance) sur les croissances de *Botrytis cinerea* et *Penicillium expansum*. En parallèle, les niveaux de production de géosmine par les deux souches de *Penicillium expansum* isolées du Val de Loire pour l'une, de la Côte bourguignonne, pour l'autre ont été recherchés.

## 2. Matériels et Méthodes

### 2.1. Les microorganismes : échantillonnage, dénombrement, identification.

Des grappes de *Pinot Noir*, des feuilles et des échantillons de sol ont été prélevés sur des parcelles de la commune de Morey-St Denis (Côte d'Or) à l'automne 2007. Chaque grappe est lavée pendant une heure dans un volume d'eau physiologique (NaCl/eau distillée, 0,9 % m/v) de même poids, contenant du Tween 80 (0,1%, v/v; MERCK-Eurolab, Lyon, France) pour mettre en suspension les micro-organismes présents à la périphérie des baies. A partir des dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-8}$  de chaque suspension de lavage, des fractions de 0,1 ml sont ensuite étalées au râteau sur milieu gélosé au Dichloran-rose Bengale (King *et al.*, 1979) et incubées à 25°C. Après 7 jours d'incubation, les moisissures sont dénombrées et isolées en culture pure. Leur identification est effectuée selon des critères morphologiques et physiologiques (Pitt et Hocking, 1999; Samson *et al.*, 2004). Pour les souches de *P. expansum*, l'identification a été confirmée par analyse biomoléculaire des séquences de  $\beta$ -tubulines (Glass et Donaldson, 1995). Ainsi, deux souches de *Botrytis cinerea* (*Bc1* et *Bc2*) et une souche de *Penicillium expansum* (*Pe25.3*) provenant des vignes de Morey-St Denis ont été sélectionnées dans cette étude, à laquelle a été associée une souche de *P. expansum* (*Pe1619*) provenant du Val de Loire, fournie par l'ITV de Tours.

### 2.2. Milieux.

Les moisissures sont entretenues sur gélose glucosée à l'extrait de pomme de terre (Potato Dextrose Agar, PDA; Ainsworth et Bisby, 1945). Le milieu de base pour l'étude de la croissance et la production de géosmine est le bouillon de Czapek (CZ-broth, Difco ; d'après Thom et Raper, 1945.), solidifié par de l'agar ( $15 \text{ g.L}^{-1}$ ) et supplémenté en cuivre (sous forme de sulfate pentahydraté - Sigma-Aldrich; Dionigi *et al.*, 1996) sur une gamme de treize concentrations : 0 ; 0,2 ; 1 ; 1,2  $\text{mM.L}^{-1}$ , puis neuf autres concentrations jusqu'à 10  $\text{mM.L}^{-1}$  (soit : 0,00; 12,70; 63,54; 76,25; 127,08; 190,62; 254,16; 317,70; 381,24; 444,78; 508,32; 571,86 et 635,40  $\text{mg.L}^{-1}$ ).

### 2.3. Inoculation et dispositif d'incubation

Les moisissures sont initialement incubées à 25°C sur milieu PDA, dans une enceinte close pour maintenir constante l'humidité ambiante (Figure 1). Au bout de 7 jours, les spores sont récoltées, dénombrées sur cellule de Malassez et mises en suspension dans de l'eau



physiologique. 10µL de suspension (standardisée à  $10^6$  sp.mL<sup>-1</sup>) sont déposés au centre de chaque boîte de milieu de Czapek. Pour chaque concentration en cuivre, les cultures sont incubées à trois températures 15, 20 et 25°C, choisies en fonction des températures optimales ( $T_{opt}$ ) de ces espèces déterminées par Correia-Judet *et al.* (2010).

#### 2.4. Recherche et dosage du cuivre

Huit semaines après la dernière application de fongicide à base de cuivre sur les parcelles, soit une semaine avant la vendange, trois types d'échantillons ont été prélevés au niveau de trois ceps: baies de raisin, feuilles et sol superficiel. Le taux de cuivre endogène ou résiduel a été recherché par spectrophotométrie d'absorption atomique après minéralisation par voie humide selon la norme NF ISO11466 (X31-415).

#### 2.5 Détection et dosage de la géosmine

L'analyse olfactive des cultures à l'issue de la période d'incubation de 7 jours a permis de vérifier l'apparition de l'odeur moisie-terreuse (GMT). Une procédure de caractérisation en deux temps est alors appliquée :

- la première permet une analyse sensorielle découlant d'un flairage direct des atmosphères sus-jacentes aux cultures par un jury entraîné,
- la seconde permet d'obtenir des signatures instrumentales et des valeurs quantitatives. Les composés volatils des cultures en boîtes de Petri sont concentrés après inclusion de la totalité du milieu gélosé avec sa colonie mycélienne dans un mélange alcool absolu/eau déminéralisée (20%, v/v) . Détection et dosage sont effectués par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse selon le protocole de Dumoulin et Riboulet, (2004). Dans ces conditions, les performances de la méthode d'extraction sont les suivantes : limite de détection : 5 ng.L<sup>-1</sup> ; répétabilité sur 2 fois 5 mesures : 6,7% à 10 ng.L<sup>-1</sup> et 6,1% à 100 ng/litre ; linéarité entre 10 et 200 ng.L<sup>-1</sup> avec un facteur de corrélation  $R^2 = 0,999$ .

### 3. Résultats

#### 3.1 Analyse de la microflore fongique du vignoble de Morey-St Denis.

##### 3.1.1 Aspects quantitatifs de la contamination

Des échantillons de raisins ont été prélevés sur 5 parcelles de vignobles de Morey-St Denis (Côte d'Or) associées au défaut GMT. Les grappes (45 à 260 g) de raisins visiblement contaminés par *Botrytis sp.*, ou d'autres moisissures, ont été lavées par une masse équivalente d'eau physiologique additionnée de Tween 80 à 0,1% (v/v). Les dénombrements effectués sur l'eau de lavage permettent d'apprécier la charge fongique (Tableau 2) en Unités Formant Colonies par gramme de raisin (UFC.g<sup>-1</sup>). Dans l'ensemble, le taux de contamination des raisins apparaît assez homogène et ne dépasse pas les 10<sup>4</sup> UFC.g<sup>-1</sup>.

##### 3.1.2 Aspects qualitatifs de la contamination

D'un point de vue qualitatif, l'identification d'une centaine de contaminants fongiques a révélé la présence prédominante de quelques genres de moisissures. Par ordre de fréquence décroissante, on remarque: *Botrytis* (53 %), *Penicillium* (23 %), *Cladosporium* (5 %), *Aspergillus* (3 %), et d'autres genres (17 %). Ces résultats confirment les identifications de la flore d'altération de la vigne rapportées par les travaux de Fleet (2003) et de Loureiro et Malfeito-Ferreira (2003). Après analyse biomoléculaire au moyen des amorces de  $\beta$ -tubulines BT2a et BT2b, une seule moisissure a été identifiée à l'espèce *Penicillium expansum* (Pe25.3). Elle a été intégrée à l'étude en cours avec une autre souche de *P.*

*expansum* (Pe1619) provenant du Val de Loire et avec deux souches de *Botrytis cinerea* (Bc1 et Bc2) provenant de Morey-St Denis.

### 3. 2. Le cuivre dans le vignoble

Les trois étages d'échantillonnage choisis dans le vignoble de Morey-St Denis témoignent de l'homogénéité de la distribution du cuivre total dans les compartiments analysés huit semaines après la dernière pulvérisation de bouillie bordelaise. Les teneurs moyennes en cuivre exprimées en ppm par rapport à la matière sèche (Figure 2) sont inférieures à 6 ppm pour les baies de *Pinot Noir*, à 400 ppm pour les feuilles et à 800 ppm pour le sol.

- **les raisins** : des teneurs en cuivre total allant de 2,95 à 5,28 ppm (mg/g de baies de raisin) témoignent de l'efficacité des précipitations estivales. Ces concentrations résiduelles en cuivre sont à rapprocher des recommandations de l'OIV pour les vins (1 ppm, soit 1 mg.L<sup>-1</sup>: [www.oiv.org](http://www.oiv.org)), mais, elles sont cependant comparables aux valeurs de 1,46 à 3,43 ppm relevées dans des jus de raisins en bouteilles de verre (Schiavo *et al.*, 2008). Néanmoins, ces concentrations en cuivre mesurées au niveau des baies de *Pinot Noir* sont toutes inférieures à celles trouvées par Garcia-Esparza *et al.* (2006) lors d'un échantillonnage (n=22) de raisins rouges italiens (11,32 ppm ± 8,61).
- **les feuilles** : le dosage du cuivre n'a porté que sur des portions du limbe; les niveaux de 334 à 393 ppm trouvés à Morey-St Denis sont supérieurs aux faibles concentrations (17 à 34 ppm) observées sur des feuilles d'un vignoble allemand (Gaertel, 1959), mais bien inférieurs aux résultats (500 à 1490 ppm) obtenus dans un vignoble portugais de la plaine de Porto (Margalhaes *et al.*, 1985). Molot et Gaimon (2004) ont modélisé que la perte de cuivre par lessivage était de nature hyperbolique, baissant jusqu'à 40% de la dose initiale après 50 mm de pluie artificielle. Néanmoins, bien que ces vignobles se situent dans trois zones géographiques aux conditions météorologiques différentes, en l'absence de relevés précis, il est difficile de supposer que ces différences de concentrations en cuivre résiduel sur les feuilles pourraient être uniquement liées aux différences de précipitations. Par ailleurs, compte tenu de la permanence de ces quelques centaines de ppm de cuivre résiduel, en Bourgogne, comme au Portugal, aucun symptôme chlorotique ou nécrotique n'a été observé sur les feuilles.
- **les sols** : les prélèvements de sol ont été effectués dans les trois premiers cm de l'horizon superficiel. On y a retrouvé de 602 à 765 ppm de cuivre total. Ce qui situe les parcelles étudiées du vignoble de Morey-St Denis dans la moyenne des sols viticoles de France, où l'on trouve des concentrations de 100 à 1500 mg.kg<sup>-1</sup> (Flores-Veles *et al.*, 1996), résultat d'un dépôt annuel de 600 tonnes de cuivre *via* les pesticides ou les engrais à base de composés organo-métalliques. Ces teneurs sont à comparer aux concentrations en cuivre dans les sols non touchés par l'action humaine, lesquels se situent sur une plage allant de 2 à 50 mg.kg<sup>-1</sup> avec une valeur moyenne d'environ 10 mg.kg<sup>-1</sup> (McKenzie, 1966).

Ainsi, dans les parcelles étudiées, le niveau de cuivre atteint, est tel que cet environnement restera encore longtemps marqué par son passé riche en fongicide à base de cuivre. Or Yamamoto *et al.* (1985) ont montré que le genre *Penicillium* était prédominant dans des sols pollués par le cuivre.

### 3. 3. Effets de la température et de la teneur en cuivre sur la croissance mycélienne.

#### 3.3.1. Cas de *Botrytis cinerea*

L'augmentation de la teneur en cuivre se traduit, initialement, par un accroissement du diamètre des colonies mycéliennes. Ainsi, l'effet du cuivre sur la croissance de *B. cinerea1* et *B. cinerea2* est positif jusqu'à une concentration de 200 à 300 mg.L<sup>-1</sup>, concentration-seuil qui varie en fonction de la température d'incubation et de la souche (Figures 3a et 3b). Bien qu'un effet-souche soit visible, du fait des profils de croissance qui ne sont pas superposables, c'est aux températures de 20 et 25°C que les colonies mycéliennes exhibent les plus grands diamètres. Ces deux valeurs de température encadrent la température optimale déterminée par Correia-Judet *et al.* (2010) pour *B. cinerea1* ( $T_{opt} = 21,4 \text{ °C} \pm 0,6 \text{ °C}$ ). Néanmoins, pour *B. cinerea1* et *B. cinerea2*, l'effet positif du cuivre sur la croissance est maximal à 20°C à la concentration de 3 mM.L<sup>-1</sup> (190,62 mg.L<sup>-1</sup>). Au delà de 3 mM.L<sup>-1</sup>, la croissance mycélienne décroît fortement, sans qu'il y ait inhibition totale du taux de croissance pour les teneurs en cuivre les plus fortes. Au dessus de 8 mM.L<sup>-1</sup>, si la germination est encore possible aux trois températures, on ne note pas de croissance mycélienne appréciable à l'œil nu.

#### 3.3.2. Cas de *Penicillium expansum*

Dans le cas de *Penicillium expansum*, le taux de croissance optimal est bien inférieur à celui de *Botrytis cinerea* (Correia-Judet *et al.*, 2010). Quelle que soit la température (Figures 4a et 5a), l'effet de faibles teneurs en cuivre sur la croissance mycélienne est peu perceptible pour des concentrations égales ou inférieures à 1, 2 mM (76,50 mg.L<sup>-1</sup>). En revanche, pour des concentrations en cuivre supérieures à 2 mM.L<sup>-1</sup>, la croissance décroît fortement. Au delà de 5 mM.L<sup>-1</sup>, la croissance apicale est de moins en moins perceptible et pour la souche isolée de Bourgogne (*P. expansum* 25.3) la germination est encore observée à 20°C jusqu'à la concentration de 10 mM.L<sup>-1</sup>.

### 3. 3. Effets de la température et de la teneur en cuivre sur la production de géosmine par *Penicillium expansum*.

Les fortes productions de géosmine par *P. expansum* 25.3 et *P. expansum* 1619 sont le plus fréquemment observées à 15 et 20°C (Figures 4b et 5b), soit à quelques degrés en dessous de la température optimale de croissance ( $T_{opt} = 23,9 \pm 1 \text{ °C}$ ; Correia-Judet *et al.*, 2010). Néanmoins, pour de faibles concentrations en cuivre, on note que, quelque soit la température, l'effet du cuivre est fortement positif jusqu'à 1 mM.L<sup>-1</sup> (*P. expansum* 25.3) ou 1,2 mM.L<sup>-1</sup> (*P. expansum* 1619).

#### 3.4.1. Cas de *P. expansum* 25.3

De la culture témoin sans cuivre jusqu'à la culture en présence de 1 mM.L<sup>-1</sup>, en fonction de la température, les performances de la culture de *P. expansum* 25.3 se traduisent à 15 et 25°C, d'une part, et à 20°C d'autre part, par des multiples de production de géosmine de 200 et de 400 respectivement, pour atteindre 2000 ng.L<sup>-1</sup> à 20°C. Au delà de 1 mM.L<sup>-1</sup>, l'effet du cuivre s'inverse et la production de géosmine fléchit fortement, pour passer dès la concentration en cuivre de 5 mM.L<sup>-1</sup> (317,70 mg L<sup>-1</sup>) sous le seuil de détection.

#### 3.4.2. Cas de *P. expansum* 1619

Bien que la production de géosmine de cette souche provenant du Val de Loire se situe à un niveau 10 fois plus faible que celle de *P. expansum* 25.3, les tendances de production de géosmine liées à l'augmentation de la teneur en cuivre sont identiques. La production de géosmine passe par un maximum (à 1,2 mM.L<sup>-1</sup>, 76,5 mg.L<sup>-1</sup>), est ensuite suivie d'une

décroissance, puis, au delà d'une teneur en cuivre de 5 mM.L<sup>-1</sup>, passe également sous le seuil de détection.

#### 4. Discussion

Le cuivre, comme cofacteur de plusieurs enzymes, est un élément essentiel pour les êtres vivants. Mais, si à de fortes concentrations, il peut entraîner l'apparition de radicaux libres hautement réactifs sur les structures cellulaires (Halliwell et Gutteridge, 1984), on note qu'il induit une résistance chez certains organismes. Ainsi, une partie de la flore fongique ayant la capacité de croître en présence de 1,6 mM de cuivre (100 mg) par kg de sol a été définie comme tolérante au cuivre (Wainwright et Gadd, 1977). Sur la base de leurs résultats de croissance, les souches de *Botrytis cinerea* (Figures 3A et 3B) et de *Penicillium expansum* (Figures 4a et 5a) peuvent être assimilées à cette mycoflore tolérante au cuivre. On remarque ainsi que jusqu'à 4 mM.L<sup>-1</sup> pour *B. cinerea* et jusqu'à 3 mM.L<sup>-1</sup> pour *P. expansum*, leur croissance est largement égale ou supérieure à la croissance en l'absence de cuivre. Néanmoins, cette tolérance au cuivre est limitée car, au delà de ces concentrations-seuils, la réduction de la croissance apicale est manifeste. Une tolérance au cuivre et à d'autres métaux lourds a été attribuée à des mécanismes d'accumulation sous forme d'adsorption à la paroi fongique ou d'absorption intracellulaire, ou à une combinaison de ces deux mécanismes (Ahuja *et al.*, 2001).

L'effet du cuivre sur la production de géosmine par *Penicillium expansum* apparaît plus limité et sans relation étroite avec la croissance apicale. Indépendamment des différences entre les niveaux de production des deux souches de *P. expansum*, on note que le maximum de production de géosmine apparaît aux concentrations en cuivre de 1 et 1,2 mM.L<sup>-1</sup>. Lorsque s'amorce le fléchissement de la croissance apicale (vers 4 mM. L<sup>-1</sup>), les niveaux de production de géosmine avoisinent déjà le niveau de détection (5 ng.L<sup>-1</sup>). On sait que les métabolites secondaires, au sein desquels se classe la géosmine, ne sont pas essentiels au bon déroulement de la croissance. On pourrait ici supposer que comme dans le cas de certains végétaux (Cobbett et Goldsbrough, 2000), jusqu'à une concentration de 4mM. L<sup>-1</sup>, le champignon modifie son métabolisme avec la production de géosmine pour s'adapter à la présence dans son environnement d'un métal toxique comme le cuivre.

Les voies de synthèse et le métabolisme de la géosmine par *Penicillium expansum* n'ont pas encore été établies. Darriet *et al.* (2000) ont montré que seule la forme (-) est synthétisée par *Streptomyces* et *Penicillium*. Chez *Streptomyces*, la voie de synthèse est étroitement liée à celle des terpénoïdes. Deux voies sont possibles, elles conduisent toutes deux à la formation de farnésyl pyrophosphate qui est transformé en géosmine. Une des réactions impliquée dans cette transformation ferait intervenir une cytochrome P450 oxydoréductase (Figure 6) dont l'activité serait influencée par le cuivre (Lamb *et al.*, 2003).

#### 5. Conclusion

Il résulte des cultures en milieu modèle présentés ici que le cuivre, jusqu'à des concentrations de 1 à 1,2 mM.L<sup>-1</sup>, selon la souche, entraîne un effet activateur sur la production de géosmine par *P. expansum*. Néanmoins, cet effet activateur du cuivre est maximisé par une température sous-optimale (20°C). Au niveau du vignoble, cela signifie qu'une limitation de la production de géosmine par *P. expansum* durant la période antérieure à la vendange, est liée à une

concentration en cuivre (issue de traitements préventifs) la plus faible possible, dans son environnement immédiat. Dans ces conditions, le faible taux de cuivre résiduel n'aurait pas de rôle activateur de la production de géosmine si la température ambiante venait se positionner pour quelque temps au dessus de la température optimale de croissance ( $T_{opt}= 23,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) .

## Références bibliographiques

- Ainsworth G.C., Bisby G.R. 1945. *A Dictionary of the Fungi*. Imperial Mycological Institute, Kew.
- Allen M.S., Lacey M.J., Harris R.L.N., Brown W.V. 1991. Methoxypyrazines in *Sauvignon blanc* grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **42** : 103-108
- Ahuja P., Mohapatre H., Saxena R.K., Gupta R. 2001. Reduced uptake as a mechanism of Zn tolerance in *Oscillatoria angustissima*. *Current Microbiology*, **43** : 305-310.
- Alvarez-Rodriguez M.L., Lopez-Ocana L., Lopez-Coronado J.M., Rodriguez E., Marinez M.J., Larriba G.R., Coque J.J. 2002. Cork taint of wines : role of filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by O-methylation of 2,4,6-trichlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology*. **68** : 5860-5869.
- Brun L.A., Maillet J., Hinsinger P., Pepin M. 2001. Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environmental pollution*, **111** : 293-302
- Charpentier C., Vincent B., Dantigny P., Bensoussan M. 2006. Incidences de la flore fongique d'altération de la vigne sur les déviations organoleptiques du vin. *Rencontre des microbiologistes de l'INRA*, Dourdan, 28-30 juin.
- Cobbett C.S., Goldsbrough P.B. 2000. Metal accumulating plants. In: Raskin, Y. and Ensley, B. (Eds), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment*, Willey, Toronto, Ont, pp. 247-270.
- Correia-Judet, D., Bollaert, S., Duquenne, A., Charpentier, C., Bensoussan, M., Dantigny, P. 2010. Validation of a predictive model for the growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on grape berries. *International journal of Food Microbiology*, **142** ; 106-13.
- Darriet P., Pons M., Lamy S., Dubourdiou D. 2000. Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48** : 4835-4838.
- Dionigi C.P., Ingram, 1994. Effects of temperature and oxygen concentration of geosmin production by *Streptomyces tendae* and *Penicillium expansum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42** :143145
- Dionigi C.P., Ahten T.S., Wartelle L.H. 1996. Effects of several metals on spore, biomass, and geosmin production by *Streptomyces tendae* and *Penicillium expansum*. *J. Ind. Microbiol.* **17**: 84-88
- Dumoulin M., Riboulet J.M. 2004. Analyse de géosmine dans les vin : apport de la microextraction en phase solide, (SPME), couplée à l'analyse par GC-SM. *Revue française d'œnologie*. **208** : 28-30.
- Fleet G.H. 2003. Yeast interactions and wine flavours. *Int . J. Food Microbiol.*, **86** : 11-22

- Flores-Vélez L.M., Ducaroir J., Jaunet A.M., Robert M. 1996. Study of the distribution of copper in an acid sandy vineyard soil by three different methods. *European Journal of Soil Science*, **47** : 523–532,
- Gaertel W. 1959. Untersuchungen über den Kupfergehalt von Rebteilen und Most. *Weinberg und Keller*, **6** : 431-440
- Garcia-Esparza M.A., Capri E., Pirzadeh P., Trevisan M. 2006. Copper content of grape and wine from italian farms. *Food Additive and Contaminants*, **23** : 274-280
- Gerber N. 1977. Three highly odorous metabolites from an actinomycete: 2-Isopropyl-3-methoxy-pyrazine, methylisoborneol, and geosmin. *Journal of Chemical Ecology*, **3** : 475-482
- Glass N.L., Donaldson G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, **61** : 1323-1330.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and diseases. *Biochemical Journal*, **219** : 1-4.
- King A.D., Hocking A.D. Pitt J.I. 1979. Dichloran Rose-Bengal Medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Applied and Environmental Microbiology*, **37** : 959-964.
- La Guerche S., Pons M., Darriet P. 2003. Etude de composés volatils associés à la pourriture des raisins et responsables de défauts olfactifs dans les moûts et les vins. *7th International Symposium of Enology* , Editions Tec & Doc (Enologie, Paris p 22-25.
- La Guerche S., Dauphin B., Pons M., Blancard D. Darriet P. 2006. Characterization of Some Mushroom and Earthy Off-Odors Microbially Induced by the Development of Rot on Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54** : 9193-9200
- Lamb D.C., Ikeda H., Nelson D.R., Ishikawa J., Skaug T., Jackson C., Omura S., Waterman M.R., Kelly S.L. 2003. Cytochrome P450 complement (CYPome) of the avermectin-producer *Streptomyces avermitilis* and comparison to that of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **307** : 610-619.
- Loureiro V., Malfeito-Ferrera M. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food microbiol.*, **86** : 23-25
- McKenzie R.M. 1966. The relation of laboratory analyses for copper, zinc, and molybdenum in some Victorian soils to the results of field trials, *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* , **6** : 170–174.
- Magalhaes M.J., Sequiera E.M., Lucas M.D. 1985. Copper and zinc in vineyards of central Portugal. *Water, Air and Soil Pollution*, **26** : 1-17
- Medsker L.L., Jenkins D., Thomas J.F. 1968. Odorous compounds in natural waters. An earthy-smelling compound associated with blue-green algae and actinomycetes. *Environ. Sci. Technol.*, **2** :461-464

- Molot B., Gaimon C. 2004. Réduction des apports cupriques en viticulture biologique. Etude du lessivage foliaire sous simulateur de pluie. *Les Entretiens Viti-Vinicoles Rhône-Méditerranée*, p. 19-22
- Piet G. J., Zoeteman B. C. J., Kraayeveld A. J. A. 1972. Earthy smelling substances in surface waters of the Netherlands. *Water Treatments Exam.*, **21** :281-286
- Pitt J.I., Hocking A.D. 1999. *Fungi and Food Spoilage*. (2nd edn.) ed., Blackie Academic and Professional, London.
- Ridal J.J., Brian Brownlee B., Lean D.R.S. 1999. Occurrence of the Odor Compounds, 2-Methylisoborneol and Geosmin in Eastern Lake Ontario and the Upper St. Lawrence River. *Journal of Great Lakes Research*, **25** :198-204
- Rosen A., Mashni C., Safferman R. 1970. Recent developments in the chemistry of odour in waters : the cause earthy/musty odour. *Water Treatments Exam.*, **19** :106-119
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. 2004. *Introduction to Food-and airborne Fungi*. 7th edn. Centraalbureau Voor Schimmelcultures (Ed), Baarn, the Netherlands.
- Sautour M., Dantigny P., Divies C., Bensoussan M. 2001. A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water activity. *Int. J. Food Microbiol.*, **67**: 63-69.
- Schiavo D., Neira J.Y., Nóbrega J.A. 2008. Direct determination of Cd, Cu and Pb in wines and grape juices by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, **76** : 1113-1118.
- Scholler C.E.G., Gürtler H., Pedersen R., Molin S., Wilkins K. 2002. Volatile metabolites from actinomycetes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50** : 2615-2621
- Silva Pereira C., Figueiredo Marques J.J., San Romao M.V. 2000. Cork taint in wine: Scientific knowledge and public perception : A critical review. *Critical Reviews in Microbiology*, **26** :147-162
- Thom C. and Raper K.B. 1945. *A Manual of the Aspergilli*. Williams and Wilkins & Co., Baltimore.
- Wainwright M., Gadd G.M. 1977. Fungi and industrial pollutants. In Wicklow D.T. and Soderstrom B. (Eds). *The Mycota IV. Environmental and microbial relationships*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 85-97.
- Yamamoto H., Tatsuyama K., Uchiwa T. 1985. Fungal flora of soil polluted with copper. *Soil Biol Biochem.*, **17**:785-790



## Liste des légendes

### Tableaux

Tableau 1. Le défaut moisi-terreux dans le domaine vinicole et les molécules impliquées

Tableau 2. Charge fongique des raisins contaminés des vignobles de Morey-St Denis.

### Figures

Figure 1. Dispositif d'incubation sous taux d'humidité contrôlé

Figure 2. Le cuivre au niveau de la vigne

Figure 3. Effets de la température et du cuivre sur la croissance de *Botrytis cinerea* (A) et *Botrytis cinrerea2* (B).

Figure 4. Effets de la température et du cuivre sur la croissance (A) et la production de géosmine (B) par *Penicillium expansum* 25.3

Figure 5. Effets de la température et du cuivre sur la croissance (A) et la production de géosmine (B) par *Penicillium expansum* 1619

Figure 6. Voie hypothétique de la synthèse de géosmine chez *Penicillium expansum*

## Tableaux

Tableau 1

<i>Molécule</i>	<i>Odeur</i>	<i>Seuil olfactif dans le vin (ng/l)</i>	<i>Rémanence au cours de la vinification</i>	<i>Références</i>
<b>Géosmine</b>	<b>Moisi, Terreux</b>	<b>50</b>	<b>Après la FA</b>	<b>Darriet <i>et al.</i>, 2000</b>
<b>2-méthylisobornéol</b>	<b>Moisi, Terreux</b>	<b>55</b>	<b>Éliminé durant la FA</b>	<b>La Guerche <i>et al.</i>, 2003</b>
<b>(+) -Fenchol</b>	<b>Terreux</b>	<b>50 000 (dans l'eau)</b>	<b>A un niveau inférieur au seuil olfactif</b>	<b>La Guerche <i>et al.</i>, 2006</b>
<b>(+) -Fenchone</b>	<b>Terreux</b>	<b>500 000 (dans l'eau)</b>	<b>A un niveau inférieur au seuil olfactif</b>	<b>La Guerche <i>et al.</i>, 2006</b>
<b>2- méthoxy-3- isopropyl-pyrazine</b>	<b>Moisi</b>	<b>5</b>	<b>Rémanence partielle après la FA</b>	<b>Allen <i>et al.</i>, 1991</b>
<b>2,4,6-trichloroanisole</b>	<b>Moisi</b>	<b>3</b>	<b>Après la FA</b>	<b>Alvarez-Rodriguez <i>et al.</i>, 2002</b>

Tableau 2

Lieux de prélèvements	Valeurs extrêmes des masses des grappes (g)	Charge fongique initiale moyenne (milieu PDA) UFC.g <sup>-1</sup>
Morey-St Denis 1	<b>75 - 245</b>	<b>10<sup>2</sup> - 10<sup>4</sup></b>
Morey-St Denis 2	<b>105 - 260</b>	<b>10<sup>2</sup> - 10<sup>4</sup></b>
Morey-St Denis 3	<b>64 - 110</b>	<b>10<sup>3</sup> - 10<sup>4</sup></b>
Morey-St Denis 4	<b>45 - 121</b>	<b>10<sup>3</sup> - 10<sup>4</sup></b>
Morey-St Denis 5	<b>75 - 150</b>	<b>10<sup>3</sup> - 10<sup>4</sup></b>

## Figures



Figure 1

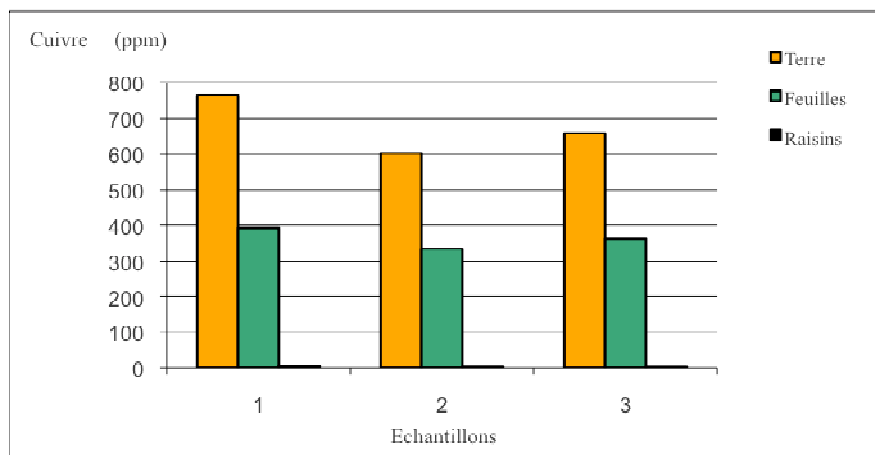
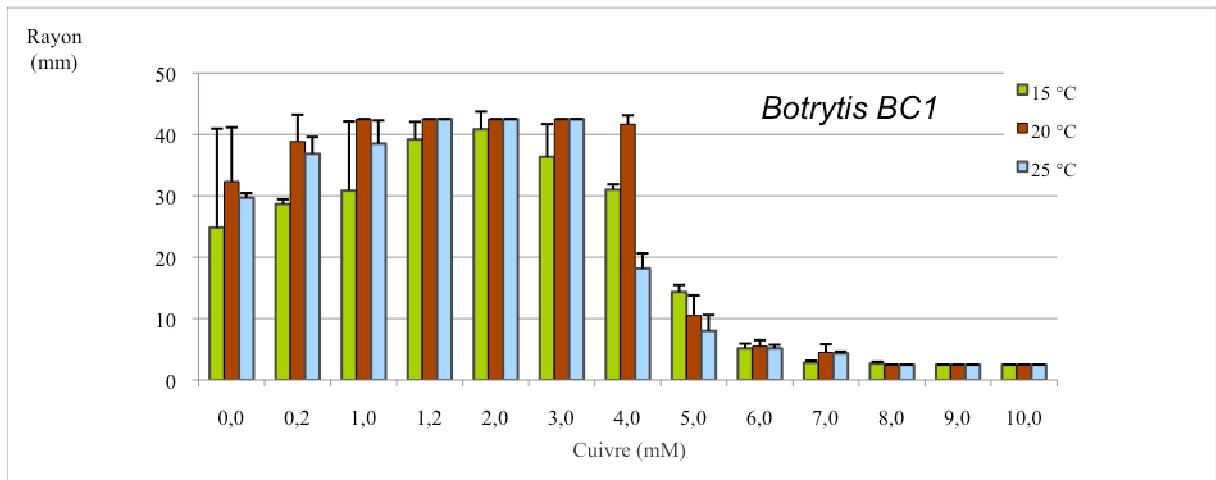


Figure 2

**a**



**b**

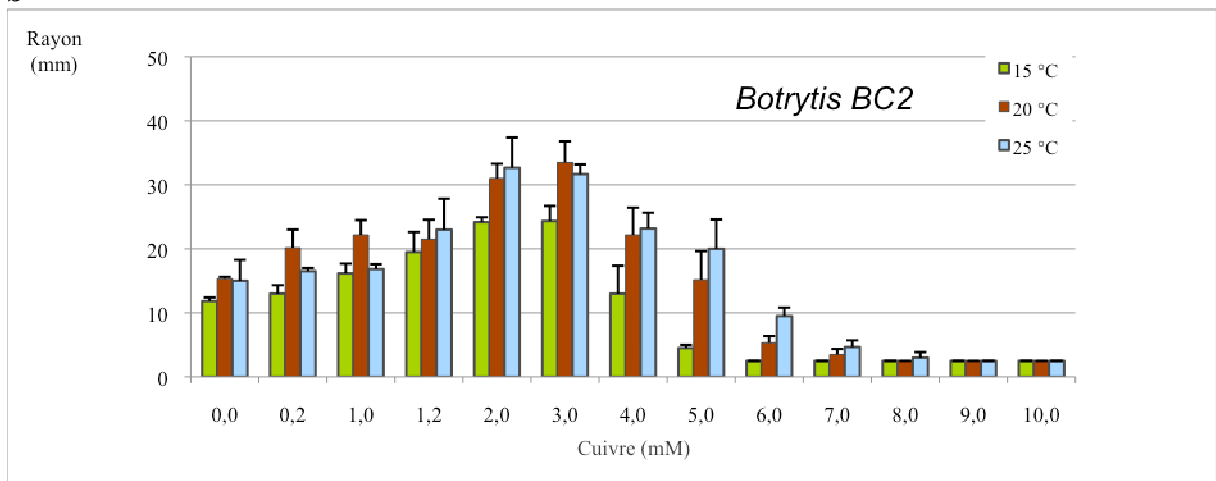
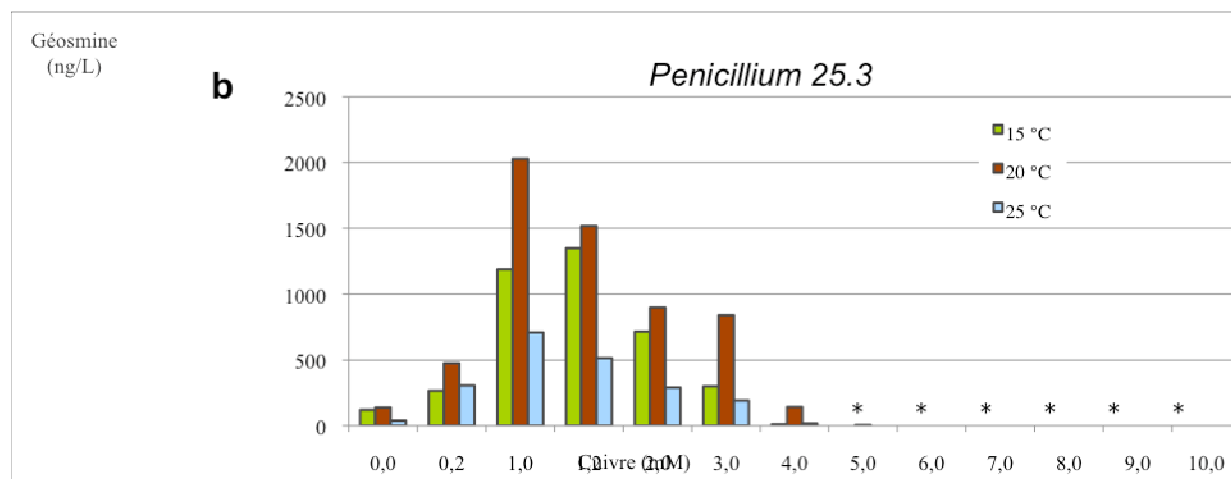
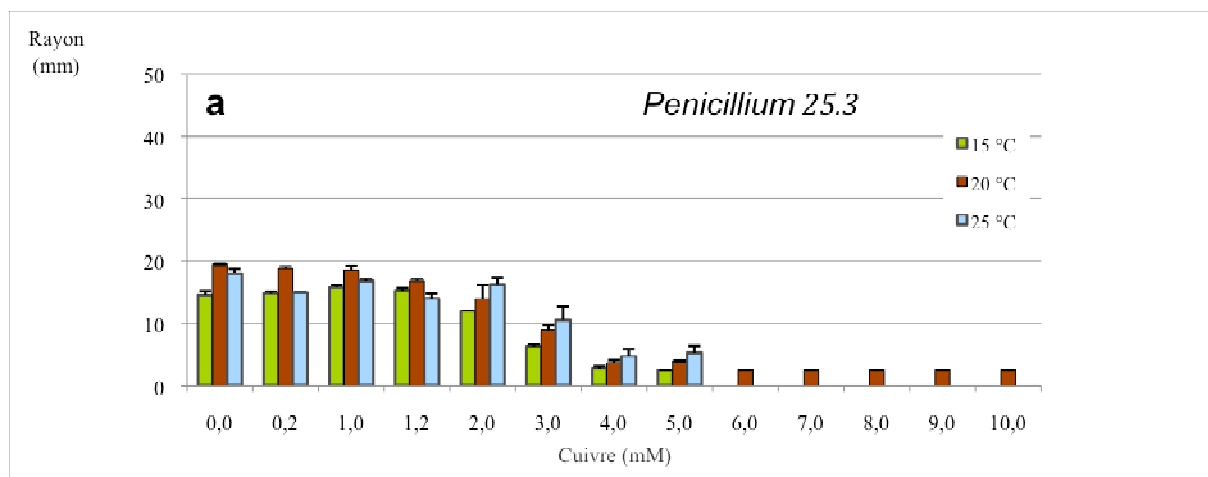
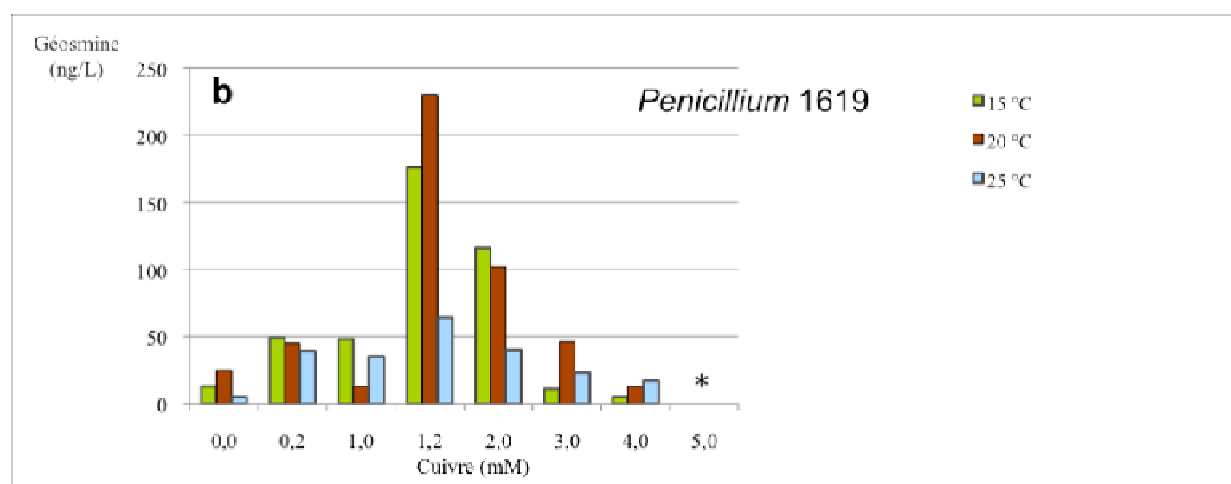
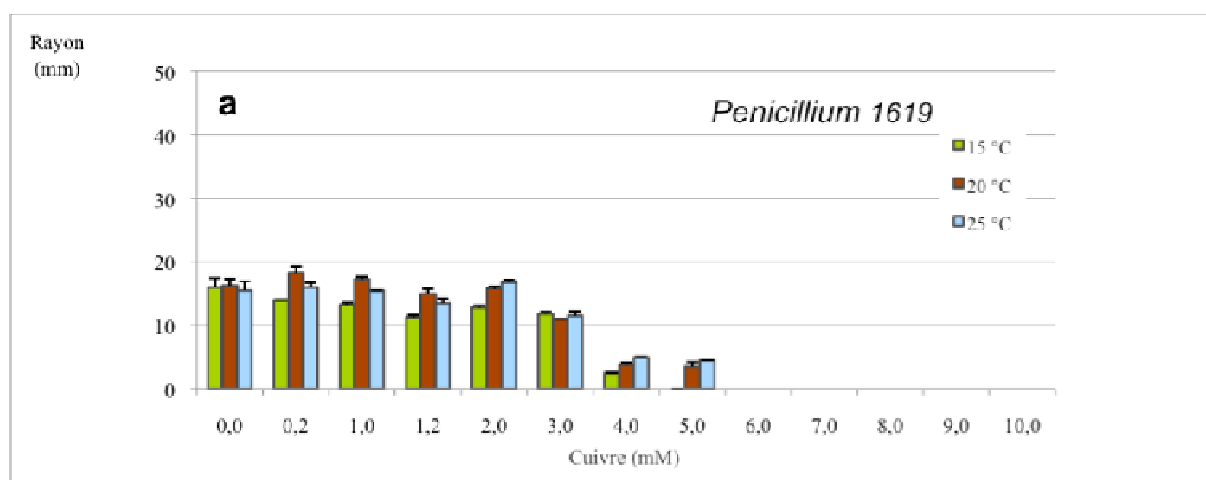


Figure 3



LDD < \*

Figure 4



LDD < \*

Figure 5

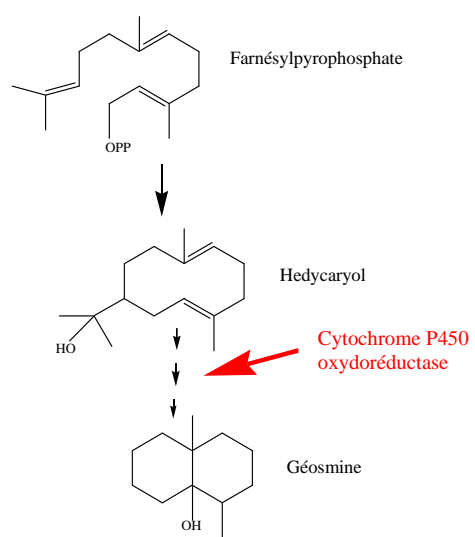


Figure 6

## ANNEXE 4

### CORREIA (Judet) Daniela

#### A-Publications

- Judet, D.**, Matei - Radoi, F., Bensoussan, M., Jurcoane, S., 2006. Studies on *Aspergillus flavus* growth and toxicity, *Romanian Biotechnological Letters* (2011 FI 0,152), **11** : 2593 - 2597.
- Judet, D.**, Bensoussan, M., Perrier - Cornet, J.M., Dantigny, P., 2008. Distributions of the growth rate of the germ tubes and germination time of *Penicillium chrysogenum* conidia depend on water activity, *Food Microbiology* (2011 FI 3,216), **25** : 902 - 907.
- Correia - Judet, D.**, Bollaert, S., Duquenne, A., Charpentier, C., Bensoussan, M., Dantigny, P., 2010. Validation of a predictive model for the combined effect of temperature and  $a_w$  on growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on grape berries, *International Journal of Food Microbiology* (2011 FI 3,011), **142** : 106 - 113.
- Dantigny, P., Nanguy, M., **Correia - Judet, D.**, Bensoussan, M., 2011. A new model for germination of fungi, *International Journal of Food Microbiology* (2011 FI 3,011), **146** : 176 - 181.
- Charpentier, C., **Correia, D.**, Dantigny, P., Bensoussan, M., 2011. Nouvelles données expérimentales concernant les effets du cuivre et de la température sur la croissance de moisissures d'altération de la vigne et la production de géosmine - responsable du goût moisi - terreux du vin, *Revue des œnologues*, **139**.
- Correia - Judet, D.**, Bensoussan, M., Charpentier, C., Dantigny, P. Combined effects of temperature, copper and CO<sub>2</sub> on geosmin production by *Penicillium expansum*, *Journal of Applied Microbiology*, (2011 FI 2,098), soumis.
- Correia - Judet, D.**, Charpentier, C., Bensoussan, M., Dantigny, P. Modelling the inhibitory effect of copper sulphate on the growth of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*, *Food Research International* (2011 FI 2,414), soumis.

#### B-Posters

- Correia - Judet, D.**, Olivier, F., Charpentier, C., Dantigny, P., Bensoussan, M. Earthy - Musty taste of wine : an organoleptic deviation associated with the metabolism of fungal spoilage flora of grapes. *4<sup>ème</sup> Congrès International Goût - Nutrition - Santé, Dijon, France, 18 - 20 Mars, 2009.*
- Correia - Judet, D.**, Boivin, A.-L., Charpentier, C., Dantigny, P., Bensoussan, M. Earthy - Musty taste of wine : effects of temperature, carbon dioxide and copper on geosmin production by *Penicillium expansum*. *5<sup>ème</sup> Congrès International Goût - Nutrition - Santé, Dijon, France, 23 - 24 Mars, 2010.*
- Correia, D.**, Boivin, A.-L., Charpentier, C., Dantigny, P., Bensoussan, M. Earthy - Musty taste of wine : application of a Doehlert design to determine the combined effects of environmental factors on geosmin production by *Penicillium expansum*. *XVI<sup>ème</sup> Forum des jeunes chercheurs, Besançon, France, 7 - 8 Juin, 2010.*
- Correia - Judet, D.**, Dantigny, P., Bensoussan, M., Charpentier, C. Geosmin production by *Penicillium expansum* is greatly dependent on the copper concentration. *22<sup>ème</sup> Congrès International ICFMH, Food Micro, Copenhagen, Danemark, 30 Août - 3 Septembre 2010.*
- Correia - Judet, D.**, Dantigny, P., Bensoussan, M., Charpentier, C. Validation of a predictive model for the combined effect of temperature and  $a_w$  on growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on grape berries. *22<sup>ème</sup> Congrès International ICFMH, Food Micro, Copenhagen, Danemark, 30 Août - 3 Septembre 2010.*



- Correia - Judet, D.,** Dantigny, P., Bensoussan, M., Charpentier, C. Tolerance of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* at high copper concentrations. 22<sup>ème</sup> Congrès International ICFMH, Food Micro, Copenhagen, Danemark, 30 Août - 3 Septembre 2010.
- Correia - Judet, D.,** Bensoussan, M., Charpentier, C., Dantigny, P. Inhibition of growth of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* by copper sulphate. 1<sup>st</sup> International CIGR Workshop Food Safety: Advances and Trends, Dijon, France, 14-15 Avril, 2011.

### C-Présentations Orales

- Correia - Judet, D.,** Olivier, F., Charpentier, C., Dantigny, P., Bensoussan, M. Growth, metabolism and genetic investigations on fungal spoilage flora of grapes. XV<sup>ème</sup> Forum des jeunes chercheurs, Dijon, France, 25 - 26 Juin, 2009.
- Correia - Judet, D.,** Dantigny, P., Bensoussan, M., Charpentier, C. Validation of a predictive model for the combined effect of temperature and  $a_w$  on growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on grape berries. 3<sup>ème</sup> Congrès International de Biotechnologie, Bucarest, Roumanie, 18 - 19 Novembre, 2010.