



UNIVERSITE DE BOURGOGNE – FRANCHE COMTE
Institut Universitaire de la Vigne et du Vin

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne – Franche Comté

Discipline : Sciences des Aliments

Spécialité : **Microbiologie**

Présentée et soutenue publiquement le 18/11/2016 par

Cédric LONGIN

Développement de méthodes permettant la détection et la quantification de microorganismes d'altération du vin ; Etude de facteurs de développement

Directeur de thèse : Pr Hervé ALEXANDRE

Co-encadrante de thèse : Dr Michèle GUILLOUX-BENATIER

Membres du Jury

Pr Patricia TAILLANDIER	INP, Toulouse	Rapporteur
Pr Nicolas ROZES	Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili	Rapporteur
Pr Isabelle MASNEUF-POMAREDE	ISVV, Université de Bordeaux	Examineur
Dr Gérald GREGORI	MIO, Université Aix-Marseille	Examineur
Pr Hervé ALEXANDRE	IUVV, Université de Bourgogne	Directeur de thèse
Dr Michèle GUILLOUX-BENATIER	IUVV, Université de Bourgogne	Co-encadrante
Dr Sandrine ROUSSEAU	IUVV, Université de Bourgogne	Membre invité
M. Jean-Philippe GERVAIS	BIVB, Beaune	Membre invité





UNIVERSITE DE BOURGOGNE – FRANCHE COMTE

Institut Universitaire de la Vigne et du Vin

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne – Franche Comté

Discipline : Sciences des Aliments

Spécialité : **Microbiologie**

Présentée et soutenue publiquement le 18/11/2016 par

Cédric LONGIN

Développement de méthodes permettant la détection et la quantification des microorganismes d'altération du vin ; Etude des facteurs de développement

Directeur de thèse : Pr Hervé ALEXANDRE

Co-encadrante de thèse : Dr Michèle GUILLOUX-BENATIER

Membres du Jury

Pr Patricia TAILLANDIER	INP, Toulouse	Rapporteur
Pr Nicolas ROZES	Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili	Rapporteur
Pr Isabelle MASNEUF-POMAREDE	ISVV, Université de Bordeaux	Examineur
Dr Gérald GREGORI	MIO, Université Aix-Marseille	Examineur
Pr Hervé ALEXANDRE	IUVV, Université de Bourgogne	Directeur de thèse
Dr Michèle GUILLOUX-BENATIER	IUVV, Université de Bourgogne	Co-encadrante
Dr Sandrine ROUSSEAU	IUVV, Université de Bourgogne	Membre invité
M. Jean-Philippe GERVAIS	BIVB, Beaune	Membre invité



Remerciements

Cette thèse a été réalisée à l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot à Dijon, au sein de l'équipe VALMiS (Vin, Aliment, Microbiologie, Stress) de l'UMR uB/Agrosup Dijon PAM (Procédés Alimentaires et Microbiologiques). Elle a pu exister grâce au soutien financier du conseil régional de Bourgogne et du Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne. Je remercie également Jean-Philippe Gervais, directeur du pôle Technique et Qualité du BIVB, d'avoir soutenu ce projet et d'avoir été attentif au déroulement de la thèse.

Je remercie sincèrement le Professeur Hervé ALEXANDRE d'avoir encadré avec rigueur cette thèse, de m'avoir fait partager ses connaissances, son expérience et de m'avoir apporté de précieux conseils tout au long de ces trois années. Je suis réellement ravi d'avoir appris à ses côtés.

Je remercie également sincèrement le Docteur Michèle GUILLOUX-BENATIER pour son suivi, son encadrement, sa patience, son dévouement et ses conseils. Je suis et je serai toujours impressionné devant ses nombreuses connaissances en microbiologie comme en chimie du vin. Je suis également ravi d'avoir passé ces trois années à ses côtés.

Je tiens également à remercier le Docteur Sandrine ROUSSEAUX pour son suivi sur les différents axes du projet GNBrett mais également pour l'avant thèse. Sans elle, je ne serai probablement pas en train d'écrire ces remerciements aujourd'hui.

Merci à tous les trois pour votre confiance. Votre complémentarité m'a beaucoup aidée et m'a permis de mener à bien ce projet.

Merci aux membres Jury qui me font l'honneur de juger ce travail de thèse. Merci de me consacrer du temps et de me faire partager votre expérience.

Je remercie le Professeur Montse POBLET et le Docteur Gérald GREGORI pour avoir participé aux comités de pilotage de ma thèse. Merci d'avoir pris le temps de vous intéresser à mon travail, d'avoir apporté vos conseils et partagé votre expertise. La visite de MIO de Marseille a été un réel plaisir avec vous Gérald, en espérant que la dégustation des vins de l'Université de Bourgogne a été bonne ensuite.

Je tiens également à dire un grand MERCI à toutes les personnes qui ont travaillé et contribué à rendre ce projet tel qu'il est aujourd'hui. Claudine, Frédérique, Clément et Antoine, vous êtes des personnes géniales et j'espère avoir de vos nouvelles par la suite. Merci également aux autres stagiaires que j'ai pu encadrer lors de cette thèse. Je souhaite également remercier Christine and the Queens avec qui nous avons passé de longues heures et qui nous a tellement aidé dans les moments difficiles au laboratoire, détestée par certains mais adorée par d'autres.

Merci beaucoup également à l'ensemble des Doctorants de l'IUVV toutes équipes confondues : Jana, Clément, Rémy, Antoine et Arnaud mais également aux anciens Cédric, Youzhong, Alexandre, Maud et Chloé sans oublier Matthias (le Texan Frenchy), et aux « vieux », Magali et notre international Mohand. Merci également à Florian et Luc. Je tiens également à adresser un mot à Juliane pour ces nombreux services et pour l'excellent schéma de cytomètre en flux qu'elle a dessiné pour nous.

Merci également à l'ensemble des titulaires de l'équipe VALMiS que j'ai pu côtoyer avec plaisir tout au long de ma thèse Vanessa, Cosette, Raphaëlle. Merci également à Stéphanie, Aurélie, Pierre, Jean et Julie (Miss Kinder Bueno). Un grand Merci également à notre international Francky...

Merci à l'équipe PAPC de l'IUVV avec Régis, Christian, Maria et Laurence avec qui j'ai pu partager des moments au travail mais également des moments de divertissement pendant la via ferrata dans le Jura, le badminton ou le futsal.

Merci à tous ceux qui ont, de près ou de loin, contribué au bon déroulement de ma thèse.

Merci à ...

Merci aux amis Dijonnais... Pauline & Sylvain, Flo & Max, Moule & Sanaa, Julie & Antoine Adeline, Delphine & Jojojo, Alex. Chaque jeudi, en sachant qu'on allait boire une « petite » bière ensemble le soir, « j'étais excité comme une puce au salon de la moquette ».

Merci également à mes fidèles amis Bressans de longue date et qui me décrivent comme un « Boulanger » : Toons & Me, Minouille, Lolo & Vina, Babac, Totor, MC2 & Alex, Margô, Jojo et notre internationale Stutu l'Indienne. Merci également à mes « autres » ami(e)s Bressans... (désolé je ne peux pas citer tout le monde...).

Nos moments passés ensemble les weekends m'ont fait un bien fou et que cela continue encore longtemps... Les amis c'est comme la famille.

Merci à toute ma famille qui a été également un soutien durant ces trois années.

Enfin...

J'adresse de nouveau un petit mot à ma cousine adorée Delphine...tu as réalisé un parcours sans faute qui me rend très fier de toi...tout cela doit probablement venir des révisions avant les partiels à 4 h du matin, du stress, des pleurs...mais aujourd'hui c'est FINI...

Merci à mes beaux-parents, Marie-Laure et Patrick, qui sont des beaux parents que beaucoup de personnes rêveraient d'avoir...merci pour les Danettes au chocolat qui m'ont réellement aidé au quotidien dans mon travail.

Merci à ma sœur chérie Cécile que j'aime très fort, qui est maintenant heureuse et épanouie dans sa vie professionnelle comme personnelle. En espérant avoir un petit(e) neveu dans pas longtemps et pouvoir le chouchouter comme il se doit...

Voilà le moment de VOUS remercier, Maman et Papa, à qui je dois TOUT aujourd'hui...vous avez toujours été là pour me soutenir tout au long de mes études...je suis tellement heureux et fier d'avoir des parents comme vous...Ne changez rien...vous êtes GENIAUX... je vous aime très fort...

Enfin, je voulais terminer en faisant des tendres et doux remerciements à Laurine... je suis très fier de toi puisque ton travail (LOL) a payé et t'a permis d'obtenir ton Master, 2^e de promo c'est vraiment pas mal... ☺ Durant ces trois années de thèse, tu m'as supporté, bichonné, réconforté, motivé... Tu me donnes le sourire dès que je pense à toi... Je t'aime ma petite Lolote...

Liste des communications scientifiques

Articles scientifiques

- Longin C.**, Guilloux-Benatier M. & Alexandre H. (2016). Design and performance testing of a DNA extraction assay for sensitive and reliable quantification of acetic acid bacteria directly in red wine using real time PCR. *Frontiers in Microbiology* 7, 831.
- Longin C.**, Degueurce C., Julliat F., Guilloux-Benatier M., Rousseaux S. & Alexandre H. (2016). Efficiency of population-dependent sulfite against *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. *Food Research International* 89, 620-630.
- Longin C.**, Petitgonnet C., Guilloux-Benatier M., Rousseaux S. & Alexandre H. (2017). Application of flow cytometry to wine microorganisms. *Food microbiology* 62, 221-231.
- Longin C.**, Julliat F., Serpaggi V., Maupeu J., Bourbon G., Rousseaux S., Guilloux-Benatier M. & Alexandre H. (Acceptée pour publication). Evaluation of 3 *Brettanomyces* qPCR commercial kits: results from an interlaboratory study. *OENO One*.
- Liu Y., Forcisi S., Harir M., Deleris-Bou M., Krieger-Weber S., Lucio M., **Longin C.**, Degueurce C., Gougeon R., Schmitt-Kopplin P. & Alexandre H. (2016). New molecular evidence of wine yeast-bacteria interaction unraveled by non-targeted exometabolomic profiling. *Metabolomics* 12, 1–16.

Communications orales

- Longin C.**, Guilloux-Benatier M. & Alexandre H. (2016). Wine spoilage bacteria quantification using FISH method coupled to flow cytometry. *19^e Congrès Annuel de l'Association Française de Cytométrie à Juan-les-Pins (France)*
- Longin C.**, Degueurce C., Julliat F., Guilloux-Benatier M., Rousseaux S. & Alexandre H. (2016). Study of the physiological response of different strains of *Brettanomyces bruxellensis* during sulfite stress at different concentrations in red wine. *22^e Forum des Jeunes Chercheurs à Besançon (France)*
- Longin C.**, Degueurce C., Julliat F., Guilloux-Benatier M., Rousseaux S. & Alexandre H. (2016). Different responses of *B. bruxellensis* after a stress sulfite in red wine according to the strains studied and levels of population. *39^{ème} Congrès Mondial de la Vigne et du Vin à Bento Gonçalves (Brésil)*
- Liu Y., Forcisi S., Harir M., Deleris-Bou M., Krieger-Weber S., Lucio M., **Longin C.**, Degueurce C., Gougeon R., Schmitt-Kopplin P. & Alexandre H. (2016). New molecular evidences of wine yeast-bacteria interaction: an answer through non-targeted metabolomics. *14th International Congress on Yeasts à Hyogo (Japon)*
- Tourdot-Maréchal R., **Longin C.**, Cirillo V., Sadoudi M., Ducerf-Gaudin A. & Drinkine-Magneux J. (2015). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* of local or domain does not exist!!! *OENO2015 à Bordeaux (France)*

Communications affichées

- Longin C.**, Julliat F., Guilloux-Benatier M., Rousseaux S. & Alexandre H. (2016). Quantification of a wine spoilage yeast by fluorescence *in situ* hybridization coupled to flow cytometry. *14th International Congress on Yeasts à Hyogo (Japon)*
- Longin C.**, Degueurce C., Julliat F., Guilloux-Benatier M., Rousseaux S. & Alexandre H. (2016). Influence of active sulfite according to the strain and the population of *B. bruxellensis* in red wine. *14th International Congress on Yeasts à Hyogo (Japon)*
- Longin C.**, Julliat F., Guilloux-Benatier M., Rousseaux S. & Alexandre H. (2016). *Brettanomyces bruxellensis* quantification in red wine is possible in less of one day by fluorescence *in situ* hybridization coupled to flow cytometry. *39^{ème} Congrès Mondial de la Vigne et du Vin à Bento Gonçalves (Brésil)*
- Longin C.**, Degueurce C., Julliat F., Guilloux-Benatier M., Rousseaux S. & Alexandre H. (2016). Effect of SO₂ on *Brettanomyces bruxellensis* according to the strains and the cell population in red wine. *6th Conference on Physiology of Yeasts and Filamentous Fungi à Lisbonne (Portugal)*
- Longin C.**, Petitgonnet C., Serpaggi V., Maupeu J., Vallet-Courbin A., Rousseaux S., Guilloux-Benatier M. & Alexandre H. (2015). Interlaboratories comparison of available *Brettanomyces* quantification kits. *OENO2015 à Bordeaux (France)*
- Longin C.**, Guilloux-Benatier M. & Alexandre H. (2015). Acetic acid bacteria detection and quantification in red wine by qPCR. *OENO2015 à Bordeaux (France)*
- Longin C.**, Guilloux-Benatier M. & Alexandre H. (2014). Acetic acid bacteria discrimination and quantification in red wine by flow cytometry. *20^e Forum des Jeunes Chercheurs à Besançon (France)*
- Liu Y., S. Forcisi, Deleris-Bou M., Krieger-Weber S., **Longin C.**, Gougeon R., Schmitt-Kopplin P. & Alexandre H. (2016). New molecular evidences of wine yeast-bacteria interaction: an answer through non-targeted metabolomics. *MacroWine à Changins (Suisse)*
- Sadoudi M., Tourdot-Maréchal R., Grangeteau C., **Longin C.**, Alexandre H. & Rousseaux S. (2014). Biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts associated with Pinot Noir and Chardonnay: focus on genera *Candida* and *Metschnikowia* combined with their oenological characteristics. *Food Micro à Nantes (France)*
- Sadoudi M., Rousseaux S., **Longin C.**, Alexandre H. & Tourdot-Marechal R. (2013). Biodiversity of indigenous yeasts of Burgundy vineyards. *XXXVI^e congrès mondial de l'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin à Bucarest (Roumanie)*
- Sadoudi M., Rousseaux S., **Longin C.**, Alexandre H. & Tourdot-Marechal R. (2012). Rediscovery of the biodiversity of indigenous yeasts from Burgundy vineyards. *IX^e congrès international des terroirs vitivinicoles à Dijon (France)*

Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre 1 Synthèse bibliographique.....	6
1 Les bactéries acétiques.....	6
1.1 Occurrence et distribution des BA durant l'élaboration du vin	6
1.1.1 Sur les raisins et dans le moût de raisin	6
1.1.2 Au cours de la fermentation alcoolique (FA)	7
1.1.3 Dans le vin	8
1.2 Cytologie.....	8
1.3 Taxonomie.....	9
1.4 Métabolisme	12
1.4.1 Métabolisme des sucres.....	12
1.4.2 Métabolisme des alcools.....	14
1.4.3 Métabolisme des acides organiques.....	16
1.4.4 Métabolisme de l'azote.....	16
1.4.5 Vitamines	16
1.5 Facteurs de développement des BA	17
1.5.1 Facteurs physicochimiques	17
1.5.2 Interactions microbiennes	18
1.6 Dénombrement et Identification	19
1.6.1 Dénombrement sur milieux sélectifs	19
1.6.2 Etat Viable Non Cultivable (VNC)	20
1.6.3 Identification	21
2 <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	26
2.1 Occurrence et distribution de <i>B. bruxellensis</i> durant l'élaboration du vin	26
2.1.1 Sur les raisins et dans le moût de raisin	26
2.1.2 En vin.....	27
2.2 Cytologie.....	27
2.3 Taxonomie.....	27
2.4 Métabolisme	28
2.4.1 Sources carbonées	28
2.4.2 Sources azotées.....	29
2.4.3 Production de phénols volatils.....	30
2.4.4 Production de tétrahydropyridines.....	32
2.4.5 Dégradation des anthocyanes.....	32
2.5 Facteurs de développement de <i>B. bruxellensis</i>	32
2.5.1 Facteurs physicochimiques	32
2.6 Dénombrement et Identification	33
2.6.1 Dénombrement sur milieux sélectifs	33
2.6.2 Etat VNC	35
2.6.3 Identification	36

3	Utilisation de la cytométrie en flux pour quantifier et déterminer l'état physiologique des microorganismes du vin	39
4	Moyens de lutte permettant de réduire les altérations dues aux microorganismes	50
4.1	<i>Méthodes préventives</i>	50
4.1.1	Bonnes pratiques	50
4.1.2	Méthode biologique.....	51
4.1.3	Pratiques œnologiques	51
4.2	<i>Mesures correctives</i>	56
4.2.1	Méthodes physiques	56
4.2.2	Méthodes chimiques.....	57
4.3	<i>Mesures d'avenir?</i>	57
4.3.1	Méthodes biologiques.....	57
4.3.2	Méthodes physiques	58
4.3.3	Méthodes chimiques.....	60

Chapitre 2 Matériels & Méthodes61

1	Les bactéries.....	61
1.1	<i>Souches bactériennes utilisées et milieux de croissance</i>	61
1.2	<i>Conditions de croissance</i>	62
1.3	<i>Développement et/ou amélioration des méthodes de quantification</i>	62
1.3.1	CMF	63
1.3.2	qPCR	68
1.4	<i>Quantification des BA par qPCR</i>	70
1.5	<i>Détermination de l'acidité volatile selon la population de BA</i>	70
2	Les levures	71
2.1	<i>Souches levuriennes et milieux de croissance</i>	71
2.2	<i>Conditions de culture</i>	72
2.3	<i>Méthodes de quantification</i>	73
2.3.1	Amélioration du protocole FISH-CMF existant.....	Erreur ! Signet non défini.
2.3.2	Etude interlaboratoires de la quantification de <i>B. bruxellensis</i> par des kits commerciaux en vin rouge.....	75
2.4	<i>Etude de la résistance de B. bruxellensis au dioxyde de soufre</i>	78
2.4.1	Conditions expérimentales	78
2.4.2	Détermination du SO ₂ libre en vin rouge	78
2.4.3	Suivi de croissance	80
2.4.4	Détermination de la perméabilité cellulaire	80
2.4.5	Détermination de la taille des levures	80
2.4.6	Dosage du 4- éthylphénol (4-EP) par UHPLC.....	80

Chapitre 3	<i>Quantification des bactéries acétiques en vin rouge</i>	832
1	Par marquages fluorescents couplés à la cytométrie en flux (CMF)	83
1.1	<i>Utilisation de marqueurs spécifiques pour la discrimination des bactéries Gram⁺/ Gram⁻</i>	83
1.1.1	Iodure d'hexidium - CMF	83
1.1.2	Lectine fluorescente – CMF	84
1.2	<i>Sonde Aceto2 couplée au fluorochrome AlexaFluor 488</i>	85
1.2.1	En milieu de culture	85
1.2.2	En vin blanc	87
1.2.3	En vin rouge	88
1.3	<i>Sonde Aceto2 couplée à l'enzyme HRP</i>	88
1.3.1	En milieu de culture	89
1.3.2	En vin rouge	89
2	Par PCR en temps réel (qPCR)	93
3	Résultats complémentaires	102
Chapitre 4	<i>Quantification de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> en vin rouge</i>	1043
1	Amélioration du protocole de quantification de <i>B. bruxellensis</i> par FISH couplée la cytométrie en flux	104
2	Comparaison inter-laboratoires de la quantification de <i>B. bruxellensis</i> en vin rouge par des kits commerciaux	123
Chapitre 5	<i>Effet du SO₂ sur <i>Brettanomyces. bruxellensis</i> en vin rouge selon la souche testée et la concentration initiale en levure</i>	1454
	Résultats complémentaires	159
	<i>Conclusions & Perspectives</i>	162
	<i>Références bibliographiques</i>	168
	<i>Annexes</i>	206

Liste des abréviations

ADH: alcool déshydrogénase

ADN=DNA: acide désoxyribonucléique

AFLP: polymorphisme de longueur des fragments amplifiés

AGB: acidic grape broth

ALDH: acétaldéhyde déshydrogénase

AOC: appellation d'origine contrôlée

APY: 2-acetyl-pyrroline

ARN: acide ribonucléique

ATHP: 2-acetyltetrahydropyridine

ATP: adénosine triphosphate

BA=AAB: bactérie acétique

BL=LAB: bactérie lactique

BSA : albumine de sérum bovin

CDCF: 5,6 carboxy 2',7' dichlorofluorescein diacetate

CECT : colección española de cultivos tipo

cF : carboxyfluorescein

CFDA-SE: 5,6 carboxyfluorescein diacetate succimidyl ester

CIP : collection of institut pasteur

CIVS : cylindrical intra-vacuolar structures

CMF=FCM : cytométrie en flux

C_q : cycle de quantification

CRB : centre de ressources biologiques œnologiques

CTAB: cetyltrimethylammonium bromide

CV6: chemchrom V6

DEFT: direct epifluorescence filter technique

DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis

DHA : dihydroxyacétone

DHE : dihydroethidium

DHR : dihydrorhodamine

DiBAC₄(3)=Box: bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol

DMDC: dicarbonate de diméthyle
DPH: 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene
DSM: deutsche sammlung von mikroorganismen und zellkulturen GmbH
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
EMA: monoazide d'éthidium
ERIC: enterobacterial repetitive intergenic consensus
ETHP: 2-éthyltetrahydropyridine
FA=AF: fermentation alcoolique
FACS: fluorescence activated cell-sorting
FDA: fluorescein di-acetate
FISH: hybridation in situ en fluorescence
FL1, FL2, FL3 et FL4: filtres 1, 2, 3 et 4 du cytomètre en flux
FML=MLF: fermentation malolactique
FSC: forward scatter
FT-IR: fourier transform infrared
g: gramme
g=RFC: relative centrifugal force
GFP: green fluorescent protein
h: heure
HI: iodure d'hexidium
HRP: horseradish peroxidase
IP=PI: iodure de propidium
ISS: international space station
ISVV: institut des sciences de la vignette et du vin
ITS: internal transcribed spacer
ITV: institut technique de la vigne et du vin
 K_M : facteur de couverture
LAMP: loop mediated isothermal amplification
LB: lysogeny broth
LED: light-emitting diode
LOD: limite de détection

LOQ: limite de quantification

LPS: lipopolysaccharides

m : mètre

MALDI-TOF-MS: matrix assisted laser desorption ionisation - time-of-flight- mass spectrometer

mg :milligramme

min: minute

NAD: nicotinamide adénine dinucléotide

NAG: N-acétyl-glucosamine

NBRC: NITE biological resource center

nm: nanomètre

NPP: nombre le plus probable

OGM: organisme génétiquement modifié

Pa: pascal

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

pH: potentiel hydrogène

PMA: propidium monoazide

PMT: photomultiplier tubes

PNA: peptid nucleic acid

PVP: polyvinylpyrrolidone

PVPP: polyvinylpolypyrrolidone

QDs: quantum dots

qPCR: PCR quantitative

Qt: percentile de la distribution du test de Student

RAPD: random amplified polymorphic DNA

REP-PCR: repetitive element palindromic PCR

RFLP: restriction fragment long polymorphism

Rh123: rhodamine 123

ROS: intracellular reactive oxygen species

SDS: sodium dodecyl sulfate

SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment

S_L: écart type entre les laboratoires

S_R: écart type de reproductibilité

S_T: écart type entre les triplicat

SSC: side scatter light

TAV: titre alcoométrique volumique

TGGE: temperature gradient gel electrophoresis

TO : thiazole orange

TSA : tyramide signal amplification

UFC= CFU : unité formant une colonie

UMR PAM : unité mixte de recherche ; procédés alimentaires et microbiologiques

UPLC : ultra performance liquid chromatography

V : volt

VAIMiS : vin, aliment, microbiologie, stress

VBT : vinaigre balsamique traditionnel

VNC=VBNC : viable non cultivable

WGA : wheat germ agglutinin

YPD : yeast extract-pepton-dextrose

µm: micrometer

4-EP=E4P: 4- éthylphénol

β-ETI : expectation tolerance interval

λ : limits of acceptability

Liste des figures

Fig. 1

Représentation schématique des parois et membranes plasmiques des bactéries Gram⁻ et Gram⁺ (Alexandre et al., 2008).

Fig. 2

Répartition des différentes formes du SO₂ en vin.

Fig 3.

Schéma d'une sonde d'oligonucléotides conjuguée à un fluorochrome.

Fig 4.

Schéma d'une sonde d'oligonucléotides conjuguée à une enzyme HRP. L'apport de son substrat conjugué à un fluorochrome permet l'accumulation de ce dernier dans la cellule.

Fig. 5

Discrimination par cytométrie en flux de *A. aceti* et *O. oeni* suite à une croissance en milieu de culture après marquage au Syto 13 (concentration finale : 20 µM) et à l'iodure d'hexidium (concentration finale : 10 µg/mL) (15 min à température ambiante) en utilisant les filtres d'émission de fluorescence verte (530 ± 15 nm) (axe des abscisses; Syto 13) et rouge (>675 nm) (axe des ordonnées; HI). Le quartile LL correspond à l'autofluorescence des cellules. Le quartile LR représente la fluorescence verte des cellules. Le quartile UR représente la fluorescence verte + rouge. Le quartile UL représente la fluorescence rouge des cellules. 20 µL ont été analysés à 34 µL/min.

Fig. 6

Fluorescence rouge de *Ga. liquefaciens* (histogramme rouge) et *O. oeni* (histogramme noir) en vin rouge après marquage à l'iodure d'hexidium (concentration finale : 10 µg/mL) par cytométrie en flux en utilisant le filtre d'émission de fluorescence rouge (> 675 nm) (axe des abscisses; HI). L'axe des ordonnées (count) représente le nombre de cellules analysées. La délimitation verticale correspond à l'autofluorescence des cellules. 20 µL ont été analysés à 34 µL/min.

Fig. 7

Mesure de la fluorescence verte (filtre d'émission de fluorescence FL1 530 ± 15 nm, axe WGA-488) émise par les BA et *O. oeni* en milieu de culture après marquage avec la lectine couplée à l'AlexaFluor® 488 (concentration finale à 20 µg/mL). L'axe des ordonnées (count) représente le nombre de cellules analysées. La délimitation verticale correspond à l'autofluorescence des cellules. 20 µL ont été analysés à 34 µL/min.

Fig. 8

Mesure de la fluorescence verte (filtre d'émission de fluorescence verte FL1 530 ± 15 nm) émise par les BA et *O. oeni* en milieu de culture après marquage avec la sonde Aceto2 couplée à l'AlexaFluor® 488 (concentration finale à 1 µM). L'axe des ordonnées (count) représente le nombre de cellules analysées. La délimitation verticale correspond à l'autofluorescence des cellules. 20 µL ont été analysés à 34 µL/min.

Fig. 9

Mesure de la fluorescence verte (filtre d'émission de fluorescence FL1 530 ± 15 nm) émise par les BA et *O. oeni* en vin blanc après marquage avec la sonde Aceto2 couplée à l'AlexaFluor® 488 (concentration finale à 1 µM). L'axe des ordonnées (count) représente le nombre de cellules analysées. La délimitation verticale correspond à l'autofluorescence des cellules. 20 µL ont été analysés à 34 µL/min.

Fig. 10

Mesure de la fluorescence verte (filtre FL1 530 ± 15 nm du cytomètre en flux) émise par *O. oeni* (histogramme rouge) et par *A. aceti* (histogramme noir) en milieu de culture après 2 h d'incubation à 35°C avec la sonde Aceto2 couplée à l'enzyme HRP (concentration finale 180 nM). L'incubation avec la TSA conjuguée à l'AlexaFluor® 488 (dilution 1/50 en tampon d'amplification) est réalisée durant 30 min à 45°C.

Fig. 11

Mesure de la fluorescence verte (FL1 530 ± 15 nm) émise par *A. aceti* et *O. oeni* en vin rouge après 2 h d'incubation à 35°C avec la sonde couplée à l'enzyme HRP (concentration finale 180 nM). L'incubation avec la TSA conjuguée à l'AlexaFluor® 488 (dilué au 1/10 en tampon d'amplification) est réalisée durant 30 min à 45°C. L'axe des ordonnées (count) représente le nombre de cellules analysées. La délimitation verticale correspond à l'autofluorescence des cellules.

Fig. 12

Courbe de corrélation représentant le SO₂ libre en fonction du SO₂ total (de 10 à 160 mg/L) ajouté au vin rouge. Les mesures ont été réalisées par la méthode Ripper automatisée.

Fig. 13

Courbe de corrélation représentant le SO₂ total en fonction du SO₂ libre (de 10 à 50 mg/L) en vin rouge. Les mesures ont été réalisées par la méthode Ripper automatisée.

Liste des tableaux

Tableau 1

Classification des 18 genres et des 86 espèces de bactéries acétiques appartenant à la famille Acetobacteraceae.

Tableau 2

Méthodes permettant la discrimination des BA selon les genres, espèces ou souches.

Tableau 3

Méthodes permettant la discrimination de *B. bruxellensis* selon son genre, son espèce ou la souche présente.

Tableau 4

Paramètres issus d'une gamme étalon réalisée en triplicat en milieu de culture de chacune des bactéries : *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *G. oxydans* et *Ga. liquefaciens*.

Introduction
générale

Introduction générale

De nombreux genres et espèces de levures sont retrouvés lors de l'élaboration du vin. L'environnement du moût de raisin permet leur croissance. Mais du fait des conditions acides du moût (pH : 3,0-3,5), cela confère un habitat naturel propice seulement pour de petits groupes microbiens qui sont acido-tolérants tels que les bactéries lactiques (BL), les bactéries acétiques (BA) et les levures.

L'activité métabolique des levures a un impact considérable sur la composition du vin et par conséquent sur ses propriétés organoleptiques (Fleet, 2003; Gil et al., 1996; Lema et al., 1996; Romano et al., 2003). De plus, les levures ont une influence majoritaire du fait de leur rôle lors de la fermentation alcoolique (FA) (Fleet, 1993) réalisée principalement par *Saccharomyces cerevisiae*. De nombreux facteurs affectent l'écologie microbienne dont la composition du jus de raisin qui est le plus important (faible pH, concentration en sucre élevée). Outre *S. cerevisiae*, de nombreux autres genres et espèces de levures sont présents durant la vinification avec des impacts importants sur la qualité du vin (positif ou négatif). De nombreuses études s'intéressent à ce jour à ces levures dites non-*Saccharomyces*.

Généralement, lorsque la FA est terminée et que les conditions sont propices, une seconde fermentation peut s'effectuer, appelée la fermentation malolactique (FML). Les bactéries retrouvées lors de cette étape sont des bactéries lactiques (BL). On peut les retrouver sur le raisin, dans le moût de raisin et dans le vin. Le raisin non endommagé contient une concentration inférieure à 10^3 cellules par gramme (Lafon-Lafourcade et al., 1983). Bien que de nombreux microorganismes soient inhibés par des concentrations d'éthanol supérieures à 4%, les espèces bactériennes éthanol-tolérantes peuvent survivre en vin. Plusieurs espèces de BL telles que *Lactobacillus* spp. et *Oenococcus oeni* peuvent croître avec de hautes concentrations en éthanol. Les BL utilisent les sucres soit par la voie homo- ou hétéro-fermentaire et assurent la FML transformant l'acide L-malique du raisin en acide L-lactique. Leur activité est recherchée pour assurer cette deuxième fermentation mais ensuite leur présence n'est plus souhaitée. En effet, des altérations telles que la pique lactique mais également l'amertume et la tourne peuvent être engendrées par la présence de ces bactéries (Alexandre et al., 2008).

Durant l'élaboration du vin, du raisin jusqu'au vin fini lors de l'élevage, de nombreux microorganismes d'altération peuvent se développer et entraîner d'importantes déviations organoleptiques aboutissant à un rejet du produit par le consommateur.

Concernant les levures d'altération, 4 groupes peuvent être mis en évidence :

Groupe 1 : levures fermentaires (*Saccharomyces cerevisiae* et *Zygosaccharomyces bailii*) ; capables de re-fermenter les sucres résiduels dans le vin en bouteille avec une forte concentration en éthanol (> 13% v/v)

Groupe 2 : levures de voile (*Hansenula*, *Pichia*, *Metschnikowia* et *Debaryomyces*)

Groupe 3 : levures désacidifiantes (*Schizosaccharomyces*) ; capables de dégrader l'acide L-malique en éthanol et gaz carbonique

Groupe 4 : altération par *Brettanomyces* spp. ; capable de produire notamment des composés à odeurs désagréables (sueur de cheval, écurie, gouache, « goût de souris »).

Cette dernière est la levure le plus souvent problématique pour les vignerons car elle engendre d'importantes déviations organoleptiques du vin. Les principales molécules odorantes entraînant l'altération sont les phénols volatils. Ces derniers sont produits suite à une décarboxylation des acides hydroxycinnamiques issus du raisin (acide *p*-coumarique, acide férulique et acide caféique) conduisant aux vinylphénols (4-vinylphénol, 4-vinylgàïacol et 4-vinylcatéchol). Ces derniers sont ensuite réduits en éthylphénols (respectivement 4-éthylphénol, 4-éthylgàïacol et 4-éthylcatéchol). Seule *B. bruxellensis* est capable de réaliser cette réduction durant la vinification ou en vin fini (Smith et Divol, 2016).

Les bactéries acétiques (BA) sont également omniprésentes tout au long de la vinification et de l'élevage du vin. Ces bactéries peuvent entraîner une augmentation de l'acide acétique (odeur de vinaigre) du vin donc de l'acidité volatile qui est réglementée au niveau Européen (CE 606/2009). Ces bactéries entraînent également la production d'acétate d'éthyle (odeur de vernis, colle, dissolvant). Ces deux composés conduisent à un durcissement du vin même à très faible

dose. Les principaux genres retrouvés en œnologie sont *Acetobacter*, *Gluconobacter* et *Gluconacetobacter*.

B. bruxellensis et les BA sont les principaux microorganismes d'altération du vin d'un point de vue organoleptique mais également visuel (fleur de surface et/ou décoloration du vin). Cela peut donc entraîner de fortes pertes économiques pour les vignerons en dépréciant les caractères de leur vin. De plus, les pratiques utilisées à la vigne mais également au chai évoluent vers une diminution de l'utilisation d'intrants afin de produire du vin dit « naturel ». Ainsi, le risque de développement microbien non désirable augmente. Il est donc nécessaire de pouvoir quantifier précisément ces microorganismes tout au long de la vie du vin de manière à pouvoir agir rapidement pour les empêcher de se développer.

De nombreuses études s'intéressent à ce sujet afin de mieux appréhender les contaminations pour éviter les altérations. Il est maintenant connu que certaines techniques comme la quantification sur boîte de Pétri n'est guère adaptée puisque certaines souches peuvent être dans le vin en état viable non cultivable en raison de la présence de dioxyde de soufre ou d'éthanol. De ce fait, des méthodes de cultures indépendantes ont été développées afin de contourner ce biais. Les plus répandues sont la PCR en temps réel ainsi que la cytométrie en flux qui est de plus en plus utilisée sur la matrice vinaire. Cependant, en vin, la présence de certains composés, inhibiteurs d'amplification de l'ADN, peut entraîner des faux négatifs ; une altération du vin peut alors se produire sans avoir quantifié de microorganismes indésirables. Une continuelle amélioration des méthodes est nécessaire afin d'obtenir une quantification des microorganismes cibles la plus précise possible. De plus, la plupart des études menées sur la quantification de ces microorganismes sont faites à partir de cultures en milieu synthétique et non à partir de vins naturellement contaminés.

Le but de cette thèse comporte 3 axes principaux:

- i) développer un protocole permettant de quantifier de façon fiable et précise les bactéries acétiques en vin rouge
- ii) développer un protocole permettant de quantifier de façon fiable et précise *Brettanomyces bruxellensis* en vin rouge

- iii) optimiser les doses de dioxyde de soufre (effet antimicrobien) à apporter au vin selon la population de *B. bruxellensis* présente.

Le principal objectif de cette thèse est d'apporter des solutions à la filière pour la quantification de ces microorganismes d'altération.

Ce manuscrit est organisé en 5 chapitres.

Le premier chapitre rassemble les connaissances actuelles sur i) la présence des BA lors de la vinification ainsi que ii) les différentes méthodes disponibles pour la détection et la quantification des BA. Puis, nous nous sommes intéressés iii) aux occurrences et à la distribution de la levure d'altération *B. bruxellensis* ainsi iv) qu'aux méthodes existantes pour la détection et la quantification de cette levure.

Le second chapitre présente les souches utilisées ainsi que les conditions de croissance afin de permettre l'adaptation de ces souches au milieu vin. Les protocoles développés lors de cette thèse sont également explicités dans cette partie.

Le troisième chapitre présente le développement de méthodes quantitatives des BA en vin rouge i) par l'utilisation de fluorochromes et d'une sonde par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) couplée à la cytométrie en flux (CMF) et ii) par PCR en temps réel (quantitative PCR; qPCR).

Le quatrième chapitre présente les résultats obtenus sur i) l'amélioration de la méthode FISH couplée à la CMF pour la quantification de *B. bruxellensis* en vin rouge ainsi que ii) les résultats de quantification de *B. bruxellensis* par des kits commerciaux lors d'une étude interlaboratoires réalisée durant ce projet de thèse.

Le cinquième et dernier chapitre s'intéresse à la relation entre la concentration initiale de *B. bruxellensis* présente en vin rouge et la réponse de la souche étudiée à différents stress sulfites. Cette étude s'intéresse notamment à deux souches, inoculées à trois concentrations initiales différentes dans quatre conditions de stress sulfite.

Ce manuscrit se clôture par une conclusion générale reprenant les principaux résultats et exposant les perspectives à venir concernant les améliorations possibles à apporter aux différents protocoles développés lors de cette thèse.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

1 Les bactéries acétiques

Les BA jouent un rôle positif et important dans certains aliments et boissons tels que le vinaigre et le cacao. Cependant, pour d'autres produits et boissons, leur présence n'est pas recherchée car la qualité des produits est fortement diminuée lorsque les conditions d'élaboration et de conservation des produits ne sont pas maîtrisées. Les BA sont répandues dans la nature et un grand nombre de souches ont été isolées à partir de sources très variées (Sengun et Karabiyikli, 2011): café arabica, plantes de café, fèves de cacao fermentées, fruits tropicaux, pommes pourries, racines de maïs, racines des cannes à sucre, cerises, fraises, raisins, fruits séchés, fleurs, pollen, riz, bières, cidres et vins.

1.1 Occurrence et distribution des BA durant l'élaboration du vin

La teneur maximale en acidité volatile d'un vin pour qu'il reste « marchand » est fixée par la législation européenne (règlement CE 606/2009). Les vins doivent ainsi présenter une teneur en acidité volatile inférieure à 18 milliéquivalents par litre (soit 0,88 g H₂SO₄/L) pour les vins blancs et rosés ou 20 milliéquivalents par litre (soit 0,98 g H₂SO₄/L) pour les vins rouges. Sachant que l'acidité volatile augmente en présence de BA, les populations de ces dernières doivent donc être maîtrisées.

Joyeux et al. (1984) ont démontré que la présence des BA est permanente au cours de la l'élaboration du vin. Une modification des espèces bactériennes présentes durant la fermentation et le stockage du vin a été démontrée.

1.1.1 Sur les raisins et dans le moût de raisin

Plusieurs facteurs affectent la colonisation des raisins par les BA, incluant la variété du raisin, la région et la saison. Les conditions de récolte et le transport du raisin et/ou du moût peuvent également favoriser ou non la croissance et la survie des BA.

Les bactéries appartenant au genre *Gluconobacter* représentées par l'espèce *G. oxydans* sont principalement détectées à la surface de la baie de raisin et dans le moût. Leurs substrats préférentiels sont les sucres en C6 : glucose et fructose (Joyeux et al., 1984). Généralement, *G. oxydans* contamine spécifiquement le raisin (Joyeux et al., 1984). Cependant, sur des raisins où *Botrytis cinerea* se développe, la population de BA augmente et se diversifie (*Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*) (Du Toit et Lambrechts, 2002). De plus, sur les raisins « botrytisés »,

le genre *Gluconobacter* croît facilement, entraînant la synthèse de composés tels que le dihydroxyacétone, le 5-oxofructose, le δ -gluconolactone à partir respectivement du glycérol, du fructose et du glucose (Barbe et al., 2000). Il y a alors une augmentation excessive du pouvoir de combinaison du moût de raisin puisque ces composés peuvent se lier avec 80% du SO₂ présent conduisant alors à une perte de son efficacité. La population de *A. aceti* devient alors plus importante sur le raisin contaminé par *Botrytis cinerea*. Les raisins sont alors riches en acide acétique et en acétate d'éthyle lorsqu'ils sont colonisés par cette bactérie (Drysdale et Fleet, 1989). Cette altération est probablement facilitée par la production d'éthanol par les levures qui se multiplient où la peau du raisin est déchirée ce qui est le cas des raisins très altérés. La population des BA augmente avec la maturation du raisin et avec la pourriture : de 10²-10³ cellules/g jusqu'à 10⁶ cellules/g sur les grappes endommagées (Barbe et al., 2001; Lafon Lafourcade et Joyeux, 1981).

Selon les conditions climatiques, la stabilisation de certains millésimes est donc particulièrement difficile (Barbe et al., 2001).

1.1.2 Au cours de la fermentation alcoolique (FA)

Lors de la FA d'un vin blanc, il a été constaté une forte diminution de la concentration en BA, bien que certaines souches de *A. aceti* peuvent acidifier le moût durant cette étape (Vaughn, 1955). La croissance des BA durant la fermentation semble dépendre du pH du moût. Dans les moûts de bas pH (pH < 3,5), une diminution de la concentration initiale, de 10⁵ à 10² bactéries/mL, en fin de FA a été observée sur des vins rouges (Du Toit et Lambrechts, 2002). Cette diminution peut également être un effet indirect du SO₂, ce dernier étant plus efficace à une faible valeur de pH (voir partie 3.1.3.7 de ce chapitre). À pH supérieur (pH 3,75), la diminution est seulement d'une unité logarithmique. *G. oxydans* survit durant la FA dans une certaine mesure et sa quasi-disparition est probablement liée à son intolérance à l'éthanol (Joyeux et al., 1984).

L'éthanol est considéré comme plus toxique envers les BA à bas pH (Dupuy et Maugenet, 1963). L'effet de différentes températures de fermentation sur la croissance des BA est peu étudié. Cependant, il semble que les différences de températures durant la fermentation de vins rouges (25 à 30°C) ne jouent pas un rôle important. Cependant, l'effet du SO₂ sur la concentration en

BA semble être plus prononcé en début de fermentation à haute température (30°C) qu'à faible température (15 à 22°C) (Du Toit et Lambrechts, 2002).

Il est clair que les BA peuvent survivre et peuvent se développer durant la FA et il est très important durant la vinification que leur concentration soit la plus faible possible. Une forte concentration en BA à la fin de fermentation peut induire la modification ou l'arrêt de celle-ci, ou peut conduire à la croissance des BA et compromettre la qualité des étapes suivant la FA.

1.1.3 Dans le vin

La quantité d'oxygène qui pénètre le bois (30 mg/L par an) entraîne une survie de la population des BA lors de l'élevage. L'élimination complète des BA se produit quand les conditions sont strictement anaérobies, comme par exemple dans les bouteilles (Joyeux et al., 1984; Lafon Lafourcade et Joyeux, 1981). Cependant, l'environnement stressant du vin : forte concentration en éthanol, faible concentration en oxygène, bas pH et faible teneur en nutriments, restreint le développement des principaux genres de BA dont *Gluconobacter* (Drysdale et Fleet, 1985; Joyeux et al., 1984).

Les *Acetobacter*, essentiellement composés des espèces *Acetobacter aceti* et *Acetobacter pasteurianus*, interviennent dans le vin fini en cours d'élevage en utilisant l'éthanol comme source de carbone organique et d'énergie. L'altération initiale du raisin représente une importante source de contamination par *A. aceti* (Joyeux et al., 1984). *A. aceti* peut survivre durant le stockage du vin en fût. Une nouvelle espèce appartenant au genre *Acetobacter*, *A. oeni* a été décrite comme altérant le vin rouge et celle-ci a été isolée récemment dans la région Dao au Portugal (Silva et al., 2006).

1.2 Cytologie

Les BA sont des cellules en forme de bâtonnets ou ellipsoïdale. Elles sont isolées seules ou sous forme de paires ou de chainettes. Leur taille varie de 0,4 à 1 µm en largeur et de 0,8 à 4,5 µm en longueur. Les BA constituent un ensemble hétérogène, comprenant des organismes mobiles avec des flagelles polaires ou péritriches (Holt et al., 1994). La paroi confère à la bactérie sa morphologie véritable. Elle constitue le squelette externe de la bactérie et représente 25 à 35 % du poids total de la bactérie. La paroi contient la pression osmotique interne. Cette paroi est le

support de l'action de certains enzymes exogènes ou endogènes et de certains antibiotiques, notamment les bêtalactamines (pénicillines) qui inhibent la synthèse du peptidoglycane. Cette paroi permet de différencier les BA qui sont Gram⁻ des autres bactéries du vin, les BL, qui sont Gram⁺ (**Fig. 1**).

Paroi des bactéries Gram négatif

Paroi des bactéries Gram positif

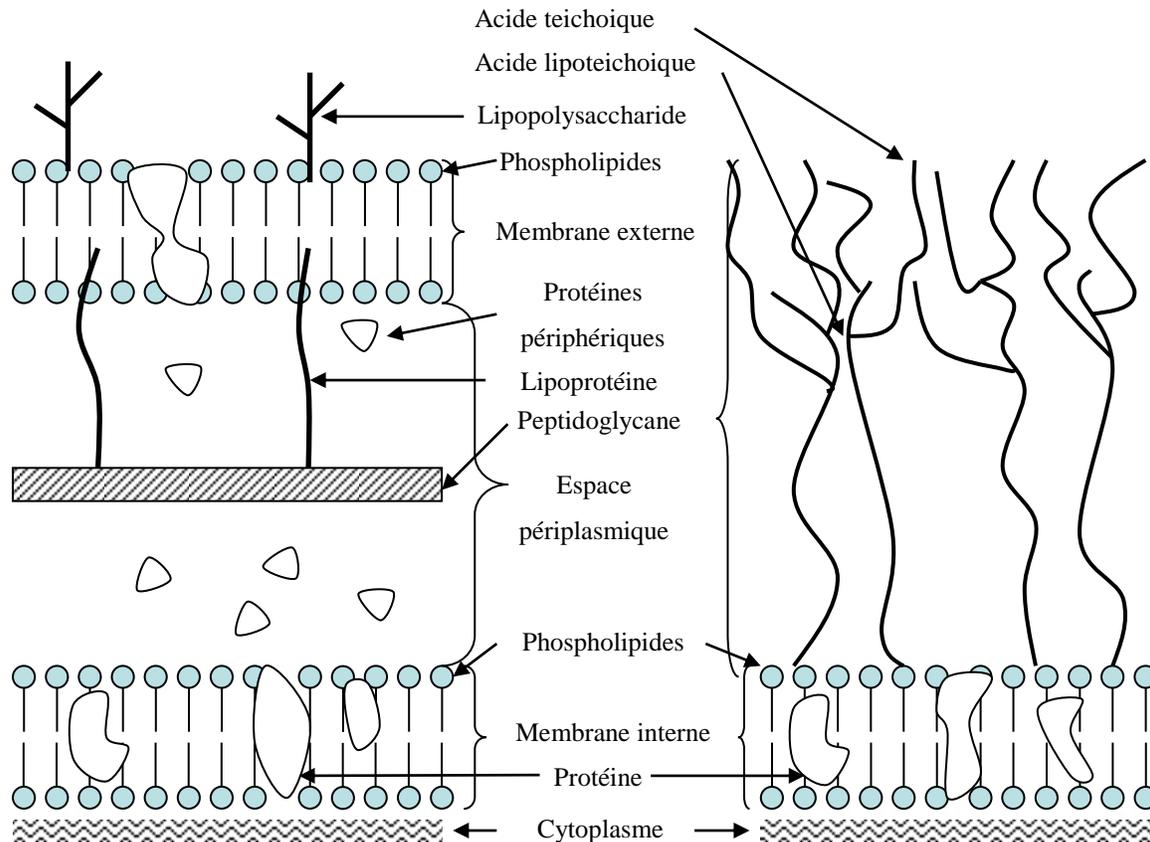


Fig. 1

Représentation schématique des parois et membranes plasmiques des bactéries Gram⁻ et Gram⁺ (Alexandre et al., 2008).

1.3 Taxonomie

Les BA appartiennent à la famille des *Acetobacteraceae* qui comportent 17 genres bactériens plus un genre considéré comme des pseudo bactéries acétiques (84 espèces + 2 pseudoespèces) (Yamada, 2016) (**Tableau 1**).

Tableau 1

Classification des 18 genres et des 86 espèces de bactéries acétiques appartenant à la famille *Acetobacteraceae*.

Genres	Espèces	Genres	Espèces
<i>Acetobacter</i> (A.)	A. Aceti	<i>Frateuria</i> (F.) ^h	<i>F. aurantia</i> ^a
	<i>A. cerevisiae</i>		<i>F. terrea</i>
	<i>A. cibirongensis</i>	<i>Gluconacetobacter</i> (Ga.)	<i>Ga. aggeris</i>
	<i>A. estunensis</i>		<i>Ga. asukensis</i>
	<i>A. fabarum</i>		<i>Ga. azotocaptans</i>
	<i>A. farinalis</i>		<i>Ga. diazotrophicus</i> ^a
	<i>A. ghanensis</i>		<i>Ga. johanna</i>
	<i>A. indonesiensis</i>		<i>Ga. liquefaciens</i> ^a
	<i>A. lambici</i>		<i>Ga. sacchari</i>
	<i>A. lovaniensis</i>		<i>Ga. takamatsuzukensis</i>
	<i>A. malorum</i>		<i>Ga. tumulicola</i>
	<i>A. nitrogenifigens</i>		<i>Ga. tumulisoli</i>
	<i>A. oeni</i>		<i>Gluconobacter</i> (G.)
	<i>A. orientalis</i>	<i>G. cerevisiae</i>	
	<i>A. okinawensis</i>	<i>G. cerinus</i>	
	<i>A. orleaniensis</i>	<i>G. frateurii</i>	
	<i>A. papayae</i>	<i>G. japonicus</i>	
	A. pasteurianus ^g	<i>G. kanchanaburiensis</i>	
	<i>A. peroxydans</i>	<i>G. kondonii</i>	
	<i>A. persici</i>	<i>G. nephelii</i>	
<i>A. pomorum</i>	G. oxydans		
<i>A. senegalensis</i>	<i>G. roseus</i>		
<i>A. sicerae</i>	<i>G. sphaericus</i>		
<i>A. syzygii</i>	<i>G. thailandicus</i>		
<i>A. tropicalis</i>	<i>G. uchimurae</i>		
<i>G. wancherniae</i>			
<i>Acidomas</i> (Ac.)	<i>Ac. methanolica</i>	<i>Granulibacter</i> (Gr.)	<i>Gr. bethesdensis</i> ^{b d e f}
<i>Ameyamaea</i> (Am.)	<i>Am. chiangmaiensis</i>		
<i>Asaia</i> (As.)	<i>As. astilbis</i>	<i>Komagataeibacter</i> (Kg.)	<i>Kg. entanii</i> ^g
	<i>As. bogorensis</i> ^{b c}		<i>Kg. europaeus</i> ^{a g}
	<i>As. krungthepensis</i> ^{b c}		<i>Kg. hansenii</i> ^{a g}
	<i>As. lannensis</i>		<i>Kg. intermedius</i> ^g
	<i>As. platycodi</i>		<i>Kg. kakiaceti</i>
	<i>As. prunellae</i>		<i>Kg. maltaceti</i>
	<i>As. siamensis</i> ^{b c}		<i>Kg. medellinensis</i>
	<i>As. spathodeae</i>		<i>Kg. nataicola</i>
<i>Endobacter</i> (E.)	<i>E. medicaginis</i>	<i>Kg. oboediens</i> ^g	

	<i>Kg. rhaeticus</i>
	<i>Kg. saccharivorans</i>
	<i>Kg. sucrofermentans</i>
	<i>Kg. swingsii</i>
	<i>Kg. xylinus</i> ^{a g}
<i>Kozakia</i> (K.)	<i>K. baliensis</i> ^{b d e}
<i>Neosaia</i> (N.)	<i>N. chiangmaiensis</i> ^{b d e}
<i>Neokomagataea</i> (Nk.)	<i>Nk. thailandica</i> ^b
	<i>Nk. tanensis</i> ^b
<i>Nguyenibacter</i> (Ng.)	<i>Ng. vanlangensis</i>
<i>Saccharibacter</i> (Sa.)	<i>Sa. floricola</i> ^{b d e}
<i>Swaminathania</i> (S.)	<i>S. salitolerans</i> ^{b c}
<i>Swingsia</i> (Sw.)	<i>Sw. samuiensis</i>
<i>Tanticharoenia</i> (T.)	<i>T. sakaeratensis</i> ^{b d e}

^a : anciennement classé dans le genre *Acetobacter*

^b : retrouvées sur les fleurs (Cleenwerck et De Vos, 2008; Yamada, 2000; Yukphan et al., 2011)

^c : retrouvées dans le riz (Loganathan et Nair, 2004)

^d : retrouvées dans le sol (Cleenwerck et De Vos, 2008)

^e : retrouvées sur des fruits en Asie (Cleenwerck et De Vos, 2008)

^f : retrouvées en milieu hospitalier (Cleenwerck et De Vos, 2008)

^g : retrouvées dans le vinaigre (Gullo et al., 2006)

^h : considérée comme une pseudo bactérie acétique (Yamada et Yukphan, 2008)

Les principales espèces retrouvées en œnologie sont en gras.

Les principales caractéristiques qui diffèrent entre les genres ont été présentées par Sengun et Karabiyikli (2011). Leur propriété commune est d'oxyder l'éthanol en acide acétique, excepté le genre *Asaia* (Yamada, 2000) qui n'en produit pas et les genres *Saccharibacter* et *Granulibacter* qui en produisent mais de façon variable selon les espèces. De plus, la composition en bases G+C de l'ADN des BA varie de 52 à 67% (Cleenwerck et De Vos, 2008).

Les genres rencontrés en vinification sont *Acetobacter*, *Gluconobacter* et *Gluconacetobacter*. Les principales différences entre ces derniers ont été compilées par Cleenwerck et De Vos (2008) :

- *Acetobacter* oxyde l'acide acétique et l'acide lactique jusqu'au stade CO₂ + H₂O ; elle est non mobile ou possède des flagelles péritriches avec une ubiquinone de type Q-9,

- *Gluconobacter* n'oxyde pas l'acide acétique et l'acide lactique jusqu'au stade $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$; elle est non mobile ou possède des flagelles polaires avec une ubiquinone de type Q-10,
- *Gluconacetobacter* oxyde l'acide lactique selon la souche considérée et l'acide acétique jusqu'au stade $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ en fonction de la concentration initiale ; elle est non mobile ou possède des flagelles péritriches avec une ubiquinone de type Q-10.

1.4 Métabolisme

Les substrats carbonés et dérivés utilisés par les BA sont très variés : hexoses, pentoses, acides organiques, alcools primaires, alcools secondaires, aldéhydes, cyclitols, polyols et glycols aliphatiques.

1.4.1 Métabolisme des sucres

Les BA sont capables d'utiliser l'arabinose, le fructose, le glucose, le galactose, le ribose et le xylose. L'oxydation directe des sucres, sans phosphorylation et incomplète, conduit aux cétones correspondantes. Le glucose est donc oxydé en acide gluconique. Chez les BA, électrons et protons sont transportés par la chaîne des cytochromes jusqu'à l'oxygène accepteur final.

Les bactéries du genre *Gluconobacter* peuvent dégrader un grand nombre de sucres : L-arabinose, D-galactose, D-glucose, D-mannose, D-xylose. Elles sont aussi capables d'oxyder l'acide gluconique en 3 sous-produits. Ces derniers peuvent réagir avec le dioxyde de soufre et rendent difficile la conservation des vins issus de raisins altérés par *Gluconobacter* (Barbe et al., 2001).

Certaines souches du genre *Acetobacter* conduisent aussi à l'acide dicétonique. De la même façon, d'autres aldoses, mannose et galactose conduisent respectivement à l'acide mannuronique et à l'acide galacturonique.

Cependant, c'est l'oxydation complète des sucres qui fournit aux bactéries l'énergie nécessaire à leur croissance. La voie métabolique d'utilisation des sucres est la voie des hexoses monophosphates. Chez *Acetobacter* s'y ajoute le cycle des acides tricarboxyliques, absent chez *Gluconobacter*. Cela est lié à la non fonctionnalité des deux enzymes du cycle, α -ketoglutarate

déshydrogénase et succinate déshydrogénase (Adams et Moss, 2000; Greenfield et Claus, 1972; Hui, 2006; Moat et al., 2003). Les enzymes de la glycolyse n'existent pas ou seulement en partie chez les BA.

L'oxydation par la voie des hexoses monophosphates débute par la phosphorylation du sucre suivie de deux réactions d'oxydation successives, la deuxième accompagnée d'une décarboxylation. Le xylulose-5-P conduit à un ensemble de réactions de transcétolisation et transaldolisation. Le bilan complet de cet ensemble de réactions est la dégradation de la molécule de glucose en 6 molécules de CO₂. Parallèlement sont réduites 12 molécules de coenzymes qui sont réoxydées par le transfert des électrons et des protons par la chaîne des cytochromes ; ce transfert génère 3 molécules d'ATP par paire de H⁺ + e⁻, soit 36 ATP pour l'oxydation d'une molécule de glucose en CO₂. Cette voie métabolique est régulée par le pH du milieu et la concentration en glucose. Elle est notamment inhibée à pH acide (pH < 3,5) et au-delà de 2 g/L de glucose environ. Dans ces conditions, le milieu s'enrichit en acide gluconique.

Les BA peuvent présenter une pigmentation en culture solide et produire différents types de polysaccharides (De Ley et al., 1984). Les dextrans de type lévane et la cellulose sont les principaux polysaccharides extracellulaires produits par le métabolisme du glucose des BA. La présence de polysaccharides est un désavantage en vinaigrerie car ils affectent la filtrabilité du produit final (Gullo et Giudici, 2008). Bien que le vinaigre balsamique traditionnel (VBT) ne soit pas filtré, les polysaccharides sont indésirables car leur présence est préjudiciable pour la qualité sensorielle du produit fini (Gullo et Giudici, 2008). Lors de l'élaboration du VBT, une couche épaisse peut être observée à la surface des barils, causée par la forte production de cellulose par les souches acétiques, qui augmentent cette production en condition statique (Hwang et al., 1999). Ramana et al. (2000) ont observé une plus grande productivité de cellulose en utilisant le mannitol comme substrat de carbone suivi par le glucose et le saccharose. Les autres sources de carbone, tels que le sorbitol, le galactose, le maltose, l'amidon et l'acide acétique, se sont avérés être des substrats pauvres produisant des quantités relativement faibles de cellulose. Diverses sources d'azote (peptone, sulfate d'ammonium ou hydrolysats de caséine) ont été jugées appropriées pour la synthèse de cellulose associée au saccharose, au glucose ou au mannitol (Ramana et al., 2000).

transporteur d'électrons intégré dans la membrane. Ces dernières sont incapables de fonctionner en réduisant le coenzyme, mais réduisent *in vitro* des accepteurs d'électrons tels que le ferricyanure et le bleu de méthylène. Ces enzymes sont probablement les plus impliquées dans l'oxydation de l'éthanol du vin, car elles fonctionnent à pH acide. À l'inverse, les enzymes cytoplasmiques, qui fonctionnent à l'intérieur de la cellule, ont un pH optimal élevé de l'ordre de 8,0.

L'activité de l'ADH est beaucoup plus stable dans des conditions acides chez les bactéries du genre *Acetobacter* que les bactéries du genre *Gluconobacter*, ce qui explique que les *Acetobacter* produisent une quantité plus élevée d'acide acétique. Cozic (1933) avait observé que l'oxydation de l'éthanol permettait la croissance de ces bactéries si l'on utilisait des accepteurs tels que la quinone ou le bleu de méthylène et que l'oxydation était inhibée par le CO₂. De plus, la deuxième étape est ralentie par l'acide acétique lui-même lorsqu'il s'accumule dans le milieu, la concentration en éthanal (acétaldéhyde) du vin peut alors augmenter. Cette transformation est à l'origine de l'augmentation d'acidité volatile dans de nombreux cas. La résistance des bactéries acétiques est souche dépendante (Nanba et al., 1984).

En aérobie, jusqu'à 75% de l'éthanal produit conduit à l'acide acétique. Dans les conditions d'une forte aération, l'oxydation et la dismutation finissent par convertir tout l'éthanol en acide acétique. Alors que si le milieu est pauvre en oxygène, l'éthanal s'accumule dans le milieu.

1.4.2.1.2 Métabolisme du glycérol

L'oxydation du glycérol conduit à la dihydroxyacétone (DHA) par la glycérol déshydrogénase (De Ley et Schell, 1959; Hauge et al., 1955). Cette dernière est une enzyme membranaire ayant comme groupement prosthétique la pyrroloquinoline quinone (Matsushita et al., 1994), avec une faible liaison avec son coenzyme. Les BA sauf *A. pasteurianus*, produisent ce composé. Cette réaction nécessite une forte oxygénation du milieu et est inhibée par l'éthanol. Il est peu probable qu'elle se produise dans le vin. Sur les raisins altérés, les conditions sont plus favorables. Les BA, en effet, y sont présentes à côté de *Botrytis cinerea* (champignon phytopathogène) dont un des principaux métabolites est le glycérol (Perez et al., 1991).

1.4.3 Métabolisme des acides organiques

Les BA sont capables de métaboliser une variété importante d'acides organiques. Elles le font par le biais du cycle des acides tricarboxyliques qui oxyde ces acides en CO₂ et H₂O. Les acides acétique, citrique, fumarique, lactique, malique, pyruvique et succinique sont complètement oxydés en CO₂ et H₂O (Holt et al., 1994).

In vitro, toutes les espèces du genre *Acetobacter* oxydent les acides D et L-lactique. Certaines souches les oxydent totalement jusqu'à obtenir du CO₂ et H₂O, mais la plupart s'arrêtent au stade de l'acide acétique. Les deux isomères sont transformés mais l'activité s'exerce avec plus d'efficacité sur l'isomère D. Le premier intermédiaire est le pyruvate, prioritairement décarboxylé en éthanal, lui-même oxydé en acide acétique par l'ALDH. Ce métabolisme ne semble pas particulièrement actif dans le vin, il n'a jamais été prouvé en tout cas qu'il puisse être à l'origine d'altérations des vins sans doute en raison des très faibles teneurs en acide D-lactique des vins.

Cependant, les bactéries du genre *Gluconobacter* qui n'ont pas de cycle fonctionnel des acides tricarboxyliques, sont incapables d'oxyder la plupart des acides organiques (Holt et al., 1994).

1.4.4 Métabolisme de l'azote

Les BA peuvent utiliser l'ammonium comme source d'azote (Alvarez et Martínez-Drets, 1995; Belly et Claus, 1972; De Ley et al., 1984). De plus, les BA ne sont pas auxotrophes vis-à-vis des acides aminés mais l'impact est différent selon l'acide aminé présent. Belly et Claus (1972) ont montré que l'acide glutamique, la glutamine, la proline et l'histidine stimulaient la croissance des BA alors que la valine est inhibitrice de la croissance de *G. oxydans*. La thréonine et l'homosérine sont inhibitrices quant à elles de la croissance de *A. aceti*, qui ne requiert pas spécifiquement de facteurs de croissance.

1.4.5 Vitamines

Les besoins nutritionnels des BA dépendent étroitement de la source de carbone. La majorité des souches sont auxotrophes pour quelques vitamines notamment l'acide *p*-aminobenzoïque (B10), la niacine (B3), la thiamine (B1) et l'acide pantothénique (B5) (Ameyama et Kondô, 1967; Gosselé et al., 1981).

1.5 Facteurs de développement des BA

Les BA sont des microorganismes aérobies obligatoires, avec un métabolisme strictement respiratoire. Les bactéries du genre *Acetobacter* préfèrent l'éthanol au glucose pour leur croissance, à l'inverse des bactéries du genre *Gluconobacter*. En conséquence, les bactéries *Acetobacter* sont davantage présentes dans les milieux alcoolisés (moût partiellement fermenté, vin) que les *Gluconobacter*, plus représentées sur le raisin et dans le moût. Elles sont catalase positives et oxydase négatives. De nombreux facteurs influent le développement des BA tels que le pH, la température, la concentration en éthanol et en oxygène, mais également les interactions entre les différents microorganismes présents.

1.5.1 Facteurs physicochimiques

1.5.1.1 Influence du pH

Le pH optimal de croissance des BA est compris entre 5 et 6 (De Ley et al., 1984). Cependant, le pH du vin est beaucoup plus bas et il a été clairement démontré que les BA sont capables de se développer dans ce milieu. Ce bas pH retrouvé généralement dans le vin (entre 3 et 4) diminue cependant la croissance bactérienne. Pour les BA, la baisse de pH limite leur prolifération mais ne joue pas sur leur survie, car des BA ont été retrouvées à pH 3 par exemple (Drysdale et Fleet, 1985). Cependant, il a été observé que la croissance de *A. aceti* est plus faible dans un vin à pH 3,4 que dans un vin à pH 3,8 (Joyeux et al., 1984).

1.5.1.2 Influence de la température

L'intervalle des températures optimales de croissance des BA est compris entre 25°C et 30°C (De Ley et al., 1984). *A. pasteurianus* a néanmoins une température optimale de croissance située autour de 20°C (Vaughn, 1955). Ainsi le stockage du vin à 18°C permet une forte augmentation de la population des BA (Joyeux et al., 1984). Une croissance peut également être observée, bien qu'elle soit très faible, dans les vins stockés à 10°C. Une augmentation de la population peut être détectée (10^3 à 10^5 UFC/mL) durant l'élaboration du vin comme par exemple durant la macération à froid (Du Toit et Lambrechts, 2002). Ainsi les basses températures utilisées lors du stockage du vin ou pendant son élevage en fût peuvent d'une part entrainer une faible croissance des BA et d'autre part ne permettent pas de les faire disparaître.

1.5.1.3 Influence de l'éthanol

L'éthanol est le principal substrat des BA durant leur croissance dans le vin. De plus, le degré de tolérance à l'éthanol dépend de l'espèce et de la souche étudiée. La majorité des souches de BA se multiplie dans un milieu contenant 5% d'alcool (environ 97% des souches testées par Gullo et al. (2006)) et certaines d'entre elles peuvent se développer aussi dans un milieu avec 10% d'alcool (environ 70% des souches testées par Gullo et al. (2006)). Il a été démontré par De Ley et al. (1984) que *G oxydans* est la moins tolérante à l'éthanol des espèces retrouvées principalement dans le vin.

1.5.1.4 Influence de l'oxygène

Les BA sont des microorganismes aérobies stricts, donc l'oxygène est un facteur déterminant pour leur croissance. Cependant, certaines BA peuvent tout de même croître malgré des conditions anaérobies durant la FA. Cela s'explique par la formation d'un biofilm à la surface du moût constitué principalement de BA qui est en contact direct avec l'air. Une petite proportion d'O₂ étant nécessaire pour la maturation du vin et notamment pour la stabilisation de la couleur des vins rouges (Mas et al., 2002), une gestion inadéquate du niveau d'oxygène pourra entraîner une croissance des BA et causer ainsi la détérioration du vin (du Toit et al., 2006).

De plus, lorsque, la disponibilité en oxygène est considérablement réduite, les BA pourraient alors se retrouver dans un état viable non cultivable (VNC) (Millet et Lonvaud-Funel, 2000) et se redévelopper ultérieurement lors de conditions plus favorables (apport d'O₂ par exemple).

1.5.2 Interactions microbiennes

Le moût de raisin contient beaucoup d'espèces de microorganismes : levures, BL et BA. Des interactions sont donc possibles au cours de l'élaboration du vin (Fleet, 2003).

Gilliland et Lacey (1964), puis Grossman et Becker (1984) et Joyeux et al. (1984) ont démontré que certaines souches de *Acetobacter* sont capables d'inhiber *Saccharomyces cerevisiae* et certaines levures indigènes. Drysdale et Fleet (1989) ont démontré que les BA n'inhibent pas fortement la croissance des levures, mais qu'elles affectent la capacité des levures à fermenter le moût de raisin. Cette inhibition de *S. cerevisiae* est principalement corrélée à la production d'acide acétique par les BA, *Ga. hansenii* et *A. pasteurianus* inhibant le plus les levures. L'acide acétique est un inhibiteur de développement des levures (Du Toit et Lambrechts, 2002),

cependant, d'autres composés pourraient être impliqués dans cet effet tels que l'éthanol, les résidus de pesticides ou le SO₂.

Très peu de travaux ont été réalisés sur l'effet des BA sur le développement des BL. Gilliland et Lacey (1964) ont démontré que des souches du genre *Acetobacter* pouvaient inhiber le développement d'espèces bactériennes du genre *Lactobacillus*, alors que Joyeux et al. (1984) ont mis en évidence que les BA stimulaient la fermentation malolactique.

1.6 Dénombrement et Identification

1.6.1 Dénombrement sur milieux sélectifs

L'isolement et la préservation des BA n'est pas facile. Or, il est important de savoir isoler des souches pures à partir de diverses sources d'habitat potentiel. Tous les milieux de croissance ne permettent pas la croissance des BA et ils sont sélectifs d'une souche à l'autre (Gullo et al., 2006). Bien qu'il existe de nombreux milieux développés pour l'isolement et/ou l'identification des BA, ceux-ci sont constitués principalement des mêmes ingrédients avec des proportions variables. Généralement, les conditions d'incubation requises pour la croissance des BA sont : 30°C durant 2 à 5 jours (Seearunruangchai et al., 2004; Yamada et Yukphan, 2008). Les BA qui sont capables de croître sur un milieu solide ont potentiellement une grande capacité métabolique. De plus, il est important de sélectionner le milieu de culture approprié à la source de l'isolat.

1.6.1.1 Milieu YPM (Yeast extract, Peptone, Mannitol)

Ce milieu a été développé initialement pour la croissance des BA. Ce milieu comprend pour 1 litre (Camu et al., 2007; Carr et Passmore, 1979; Gullo et Giudici, 2008; Sokollek et al., 1998):

- mannitol	25 g
- extrait de levures	5 g
- peptone	3 g

1.6.1.2 Milieu GYC (Glucose, Yeast extract, CaCO₃)

Ce milieu est proposé comme le milieu permettant d'isoler la plupart des souches retrouvées dans le vinaigre traditionnel (Gullo et al., 2006). L'addition de CaCO₃ permet de neutraliser l'acidité produite par les bactéries. La formation d'un halo est une caractéristique fondamentale qui

associe une colonie donnée au groupe des BA (Cleenwerck et De Vos, 2008). Ce milieu comprend par litre (Carr et Passmore, 1979):

- glucose 100 g
- extrait de levures 10 g
- CaCO₃ 20 g

1.6.1.3 Milieu AE

Ce milieu de culture a montré une meilleure spécificité pour l'isolement des BA présentes dans la production de vinaigre de spiritueux (Sokollek et al., 1998). Ce milieu comprend pour 1 litre (Yamada et al., 1999):

- glucose 5 g
- extrait de levures 3 g
- peptone 4 g
- éthanol 30 mL
- acide acétique 30 mL

Ce milieu peut être également « renforcé ». Il s'avère ainsi plus approprié pour isoler les BA présentes dans le cidre et le vinaigre produit à partir de vin (Sokollek et al., 1998). Ce milieu comprend pour 1 litre (Zahoor et al., 2006):

- glucose 40 g
- extrait de levures 10 g
- peptone 10 g
- Na₂HPO₄.H₂O 3,38 g
- éthanol 20 mL
- acide acétique 10 mL
- acide citrique 1,5 g

1.6.2 Etat Viable Non Cultivable (VNC)

L'état VNC est un état physiologique particulier des microorganismes (Xu et al., 1982). Les cellules de levures viables ont une intégrité membranaire, une activité enzymatique, la capacité à avoir une activité métabolique (Boyd et al., 2003; Guillou et al., 2003; Lloyd and Hayes, 1995),

et sont capables de former des colonies sur milieux gélosés. Lorsqu'elles perdent cette capacité, elles sont alors considérées comme mortes. L'état métabolique particulier dit VNC correspond à des cellules toujours actives métaboliquement, mais dans l'incapacité de se multiplier, et ce notamment sur les milieux gélosés utilisés habituellement pour leur numération. L'état VNC est pensé comme une stratégie des cellules mise en place pour résister aux conditions environnementales difficiles (Oliver, 1995). Par contre, une levure en état VNC doit être capable, lorsque les conditions du milieu redeviennent favorables, de se multiplier et redevenir cultivable sur milieu gélosé. On parle alors de « ressuscitation » (Salma, 2013; Serpaggi, 2011).

Le milieu liquide comme le vin présentant une forte concentration en éthanol, une présence de SO₂ libre et une faible disponibilité de l'oxygène entraîne un stress important des microorganismes. Plusieurs études ont montré qu'il était difficile de faire croître les BA sur milieu de culture lorsque celles-ci sont issues d'un milieu stressant tel que le vin (Bartowsky et al., 2003; Millet et Lonvaud-Funel, 2000; Sievers et al., 1992; Sokollek et al., 1998; Trček, 2005). Ces derniers ont probablement besoin de s'adapter avant de pouvoir se développer sur milieu solide avec une source de carbone différente.

Du Toit et al. (2005) ont suggéré que *A. pasteurianus* peut survivre en état VNC quand il n'y a pas d'apport en oxygène dans le vin. Donc, un enrichissement du milieu en oxygène, par agitation de la culture durant l'incubation, a été proposé afin d'augmenter le potentiel de culture des BA ou de mettre un terme au statut VNC (Millet et Lonvaud-Funel, 2000).

1.6.3 Identification

1.6.3.1 Sans quantification

La coloration de Gram permet d'identifier dans un milieu les bactéries acétiques (coloration rose) des autres bactéries Gram⁺ (notamment les bactéries lactiques colorées alors en violet). Cette technique ne permet cependant pas de discriminer les BA entre elles (Sizemore et al., 1990). Ainsi de nombreuses techniques principalement de biologie moléculaire ont alors été développées afin de permettre la mise en évidence de la présence des BA dans le milieu analysé. Un dénombrement semi-quantitatif peut être effectué avec certaines de ces méthodes (**Tableau 2**).

Tableau 2

Méthodes permettant la discrimination des BA selon les genres, espèces ou souches.

Spécificité des méthodes	Méthodes	Références
Sans discrimination entre les genres	Nested PCR	González et al. (2006); Ruiz et al. (2000)
	Mise en évidence du gène <i>adhA</i>	Trcek (2005)
Discrimination Interspécifique	DGGE	De Vero et Giudici, (2008) ; De Vero et al. (2006)
	TGGE	Ilabaca et al. (2008)
	PCR-RFLP	Ruiz et al. (2000)
	Hybridation ADN-ADN	Lisdiyanti et al. (2001) ; Lisdiyanti et al. (2006) ; Dellaglio et al. (2005)
	MALDI-TOF MS	Andrés-Barrao et al. (2013)
Discrimination Intraspécifique	PCR-ITS-RFLP	Ruiz et al. (2000)
	RAPD	Nanda et al. (2001) ; Bartowsky et al. (2003); Laohaprerththisan et al. (2003) ; De Vuyst et al. (2008)
	AFLP	Cleenwerck et al. (2009)
	ERIC-PCR	González et al. (2005)
	REP-PCR	González et al. (2005)

1.6.3.2 Avec quantification

Du fait de l'état VNC et des problèmes rencontrés pour la culture des BA sur milieu gélosé (méthodes culture-dépendantes), il est important de développer des techniques dites culture-indépendantes.

1.6.3.2.1 Différenciation Gram⁺/Gram⁻ par cytométrie de flux

La cytométrie en flux est de plus en plus utilisée sur les microorganismes du vin en milieu synthétique, cependant très peu d'études sont réalisées directement en matrice vinaire. Une revue a été rédigée récemment répertoriant les différentes et nombreuses études appliquant la cytométrie en flux aux microorganismes du vin (voir Revue rédigée au cours de cette thèse et insérée partie 3. de ce chapitre).

Il existe plusieurs techniques permettant de discriminer les bactéries Gram⁻ des Gram⁺. En cytométrie de flux, il est possible de discriminer les bactéries à Gram⁺ et Gram⁻ par un fluorochrome appelé iodure d'hexidium (HI).

Mason et al. (1998) ont ainsi testé de nombreuses souches bactériennes en milieu de culture. Le marquage est réalisé par des fluorochromes se fixant aux acides nucléiques, HI (Molecular

Probes®, H-7593) et Syto 13 (Molecular Probes®, S-7575), sur les microorganismes non fixés en suspension. HI pénètre dans les bactéries Gram⁺ mais pas dans les bactéries Gram⁻. Cela est probablement dû à la couche externe de lipopolysaccharides (LPS) des bactéries Gram⁻ empêchant l'entrée du HI. Car, lorsque ces bactéries sont exposées à de l'EDTA ou de l'éthanol, entraînant la déstabilisation de la couche de LPS, les bactéries Gram⁻ sont perméables au HI. Donc, ce marqueur permet également d'obtenir une indication sur l'intégrité membranaire des bactéries Gram⁻ (Mason et al., 1998). Le Syto 13 pénètre quant à lui dans les deux types de microorganismes entraînant la coloration de toutes les cellules. Quand les fluorochromes sont utilisés ensemble, les bactéries Gram⁻ émettent une fluorescence dans le vert par le Syto 13, alors que les bactéries Gram⁺ émettent une fluorescence dans le orange-rouge par l'addition des couleurs du HI et du Syto 13. Cette technique permet de classifier correctement les bactéries Gram⁺ anaérobies car la décoloration de celles-ci au cours de la coloration de Gram traditionnelle peut entraîner des résultats douteux (Mason et al., 1998). Forster et al. (2002) ont également utilisé le fluorochrome HI couplé à la CMF pour discriminer les bactéries Gram⁺ des bactéries Gram⁻ dans les boues actives.

Holm et Jespersen (2003) ont quant à eux développé une méthode permettant une discrimination des bactéries Gram⁺ des bactéries Gram⁻ dans le lait en utilisant une lectine couplée à un fluorochrome (Wheat Germ agglutinin ; WGA). Cette lectine va se lier aux acides sialiques et aux résidus de N-acétyl-glucosamine (NAG), constituants du peptidoglycane et retrouvés en surface des bactéries Gram⁺.

Avec ces méthodes, une discrimination entre les bactéries Gram⁺ et Gram⁻ pourrait être appliquée en milieu vin. Cependant, aucune identification spécifique n'est possible.

1.6.3.2.2 Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

L'hybridation *in situ* en fluorescence est une technique de biologie moléculaire utilisant des sondes marquées à l'aide d'un marqueur fluorescent. Les sondes utilisées ciblent le plus souvent l'ADN et l'ARN.

Les sondes spécifiques peuvent être dessinées afin de discriminer les BA entre elles. Franke-Whittle et al. (2005) ont utilisé la méthode FISH afin de détecter *Ga. sacchari* et d'autres

microorganismes du vin tels que les BL (Blasco et al., 2003). Cette méthode de détection et de quantification ne demande pas de cultures préalables des bactéries. Le marquage est réalisé par des sondes fluorescentes qui s'hybrident spécifiquement selon les genres ou les espèces étudiés. Cependant, pour les espèces appartenant aux genres *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* et *Komagataeibacter*, il a été démontré qu'il était très difficile de développer une sonde spécifique à un seul genre (Trček et al., 2016) du fait de leur grande similarité au niveau de l'ARNr 16S. Néanmoins, la sonde Komag-FITC développée lors de cette étude se lie spécifiquement à *Komagataeibacter europaeus*, *Komagataeibacter oboediens* et *Komagataeibacter intermedius* (voir Revue rédigée au cours de cette thèse et insérée partie 3. de ce chapitre).

1.6.3.2.3 Real-time PCR

Les BA sont des microorganismes exigeants, avec une faible production de biomasse lors de leur culture, donc l'extraction de leur ADN doit être efficace afin de les quantifier. Jara et al. (2008) ont comparé 5 méthodes d'extraction directement sur des échantillons de vin et de vinaigre :

- CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) : adaptation de la méthode à une vaste plage de matrices alimentaires brutes et transformées
- Choc thermique : perturbation gel (-20°C) – dégel (15 min à 95°C) (González et al., 2006)
- Mo-Bio : avec le kit PowerSoil DNA Isolation (Mo-Bio Laboratories, Inc.)
- NucleoSpin : avec le kit d'extraction d'ADN génomique NucleoSpin Food (Macherey-Nagel)
- Wizard : avec le kit de purification de l'ADN génomique Wizard (Promega).

Quatre matrices (1 vin blanc, 1 vin rouge et 2 vinaigres) contaminées avec deux souches de BA appartenant aux espèces *Acetobacter pasteurianus* et *Gluconacetobacter hansenii* ont été testées. Jara et al. (2008) ont conclu que la méthode d'extraction d'ADN CTAB des BA offre une plus grande qualité d'extraction et un rendement plus élevé pour les matrices vins. Alors que pour le vinaigre, la méthode NucleoSpin est la meilleure même si le rendement est similaire à la méthode CTAB.

La PCR en temps réel ou qPCR est une méthode utilisant une approche moléculaire comme la méthode FISH et l'épifluorescence (Blasco et al., 2003). Cette technique est rapide, sensible et

précise pour la quantification des bactéries dans un échantillon (Harms et al., 2003; Huijsdens et al., 2002). La qPCR permet également de déterminer la concentration initiale en ADN que présente l'échantillon, et même une estimation de la concentration microbienne (Bleve et al., 2003). Cette méthode est utilisée pour la détection de nombreuses bactéries (Luo et al., 2004; Rousselon et al., 2004).

González et al. (2006) ont étudié la quantification des BA en vin artificiellement contaminé, en vinaigre et en vin. Puis, Torija et al. (2010) et Valera et al. (2013) ont développé des sondes TaqMan Minor Groove Binder (MGB), fluorescentes lors de l'élongation du fragment d'ADN amplifié afin de détecter spécifiquement et quantifier 5 espèces de BA (*A. pasteurianus*, *A. aceti*, *Ga. hansenii*, *Ga. europaeus* et *G. oxydans*) présentes dans le vin et le vinaigre. Les amorces et les sondes, dessinées à partir du gène codant pour l'ARNr 16S, montrent une forte spécificité avec les espèces BA cibles. Avec cette technique, une concentration inférieure à 10^2 - 10^3 cellules par mL peut être détectée. Ces travaux explicitent que lorsque la concentration est inférieure au seuil précédemment décrit, une pré-PCR de la région ITS incluant l'ADNr 16S-23S est réalisée afin d'augmenter les cibles ADN. Cependant, lorsque cette pré-PCR est réalisée, la quantification bactérienne n'est alors plus possible. Puis, Valera et al. (2015) ont développé de nouvelles amorces (AAB-F et AAB-R) afin de permettre une quantification totale des BA.

En plus de la possibilité de quantifier les BA, la PCR en temps réel est une méthode qui permet de détecter les cellules dans un état VNC (González et al., 2006). Cependant cette méthode entraîne une surestimation de la population vivante. Afin de palier à ce biais, le monoazide propidium (PMA) peut être utilisé (Rizzotti et al., 2015; Vendrame et al., 2013) mais les cellules exposées à un stress comme l'éthanol, connu pour perméabiliser la membrane cellulaire (Alexandre et al., 1994), peut entraîner un marquage des cellules avec l'IP par exemple, alors qu'elles sont vivantes (Davey et Hexley, 2011). De plus, Shi et al. (2012) ont mis en évidence en vin une sous-estimation de la population levurienne totale, de *S. cerevisiae*, de la population BL totale, de BL non-*O. oeni* et de la population BA totale par la méthode qPCR couplée à l'utilisation du monoazide d'éthidium (EMA). Cependant, ils ont démontré que si les microorganismes sont mis dans un milieu de récupération pendant 40 min, il est alors possible de dénombrer à la fois les cellules vivantes et les cellules stressées.

2 *Brettanomyces bruxellensis*

Brettanomyces est une levure ubiquitaire retrouvée dans la nature. Elle est souvent retrouvée dans les produits alimentaires fermentés tels que le fromage et lait fermenté mais aussi dans les boissons alcoolisées telles que la bière, le cidre et le vin. Cette levure n'est pas considérée comme une levure d'altération dans la bière car elle contribue à la synthèse d'arômes recherchés. Dans le vin par contre, elle est considérée comme un microorganisme d'altération.

2.1 Occurrence et distribution de *B. bruxellensis* durant l'élaboration du vin

Brettanomyces / *Dekkera* spp. est isolée à partir du vin et particulièrement dans les vins rouges. Cette levure est cependant aussi retrouvée dans le vin blanc, mais beaucoup moins fréquemment (Dias et al., 2003; Licker et al., 1998). Cela semble venir du fait que le vin blanc a une valeur de pH plus bas que le vin rouge rendant plus efficace le dioxyde de soufre (SO₂) utilisé comme antiseptique (Loureiro et Malfeita-Ferreira, 2006).

2.1.1 Sur les raisins et dans le moût de raisin

Le processus d'élaboration du vin présente de multiples sources où *Brettanomyces* / *Dekkera* spp. peut survivre et de nombreux débats sur la source initiale et la dispersion de ces levures ont été réalisés (Licker et al., 1998). Sur le raisin, il semble qu'il y ait une relation entre le fait de retrouver *Brettanomyces* et la qualité sanitaire du raisin. En effet, la présence de *Brettanomyces* semble corrélée à celle du champignon *Botrytis cinerea* (Taillandier et al., 2008). Une seule étude montre l'isolement de cette levure à partir du raisin (Renouf et Lonvaud-Funel, 2007) malgré le fait qu'elles aient été isolées de nombreuses fois durant la fermentation du moût de raisin (Jolly et al., 2003; Licker et al., 1998; Prakitchaiwattana et al., 2004; Pretorius, 2000). Cette faible détection sur le raisin pourrait provenir du fait qu'elles sont en faible concentration au milieu d'un écosystème microbien diversifié où d'autres espèces de levures et de bactéries dominent. Cela peut également venir du fait de leur faible vitesse de croissance. Afin de contourner ce problème et de permettre tout de même la quantification de cette levure sur le raisin, Renouf et Lonvaud-Funel (2007) ont développé un milieu spécifique d'enrichissement.

2.1.2 En vin

Brettanomyces est donc plus souvent retrouvée associée avec le vin ou avec le matériel de la cave (Fugelsang, 1998). Sa présence est le plus souvent très faible par rapport au nombre important de levures à fermentation rapide comme *Saccharomyces cerevisiae* par exemple.

Brettanomyces est retrouvée dans des conditions de faibles concentrations en SO₂ libre, avec des faibles concentrations en sucres résiduels et avec des nutriments, relargués suite à une autolyse des levures du milieu.

De nombreux vins finis et mis en bouteille contiennent des populations plus ou moins importantes de *Brettanomyces*. Le plus souvent ces vins ont une longue période de vieillissement en fût de chêne couplée à de faibles concentrations en SO₂ ainsi qu'une filtration avec une faible efficacité avant la mise en bouteille (Arvik et al., 2002; Heresztyn, 1986b). *Brettanomyces* est également retrouvée dans des échantillons d'air de la cave, sur le matériel, les drains, les pompes et les tuyaux de transfert du vin. Donc, il n'est pas surprenant que la cave soit souvent considérée comme la première source de contamination par *Brettanomyces*.

Brettanomyces bruxellensis est une levure d'altération peu exigeante en sources nutritives et résistante à l'éthanol (Conterno et al., 2006) ainsi qu'aux bas pH et peut s'implanter à tout moment de la vinification.

2.2 Cytologie

Les cellules végétatives ont une forme ogivale qui résulte de leurs nombreux bourgeonnements polaires. Des formes sphériques, ellipsoïdales et cylindriques ont également été observées. Elles peuvent être aussi présentes sous forme de chainettes, probablement dues à une séparation incomplète des cellules filles. De plus, la taille et la morphologie de cette levure sont très variables selon les conditions de culture et la phase de croissance (Aguilar-Uscanga et al., 2000; Dickinson, 1996; Vigentini et al., 2013).

2.3 Taxonomie

Brettanomyces a été isolé pour la 1^{ère} fois en vin en 1960 (Kunkee et Amerine, 1970; Van der Walt et Van Kerken, 1960). Un lien entre l'altération du vin rouge et la présence de

Brettanomyces a été mis en évidence bien après par Chatonnet et al. (1995) quand ils ont montré que *Brettanomyces* a la capacité de produire le 4-éthylphénol, à partir de l'acide *p*-coumarique, composé très négatif car donnant des odeurs de sueur de cheval et/ou d'écurie.

Les genres *Brettanomyces* et *Dekkera* présentent conjointement les espèces *Brettanomyces anomalus* et *Brettanomyces bruxellensis*. La différence entre les deux genres est que *Brettanomyces* est la forme non sporulante (anamorphe) alors que *Dekkera* est la forme sporulante (téléomorphe). Les formes sporulantes de *Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces naardenensis* et *Brettanomyces nanus* n'ont jamais été détectées à ce jour.

2.4 Métabolisme

2.4.1 Sources carbonées

2.4.1.1 Métabolisme des alcools

Brettanomyces bruxellensis est capable de métaboliser l'éthanol. Vigentini et al. (2008) ont trouvé que sous condition de semi-anaérobiose, cette levure ne pouvait pas utiliser l'éthanol quand il est la seule source de carbone disponible. Cependant, Conterno et al. (2006) et Dias et al. (2003) ont démontré que *B. bruxellensis* pouvait utiliser l'éthanol comme source unique de carbone. Ces dernières études n'ont cependant pas détaillé les conditions de croissance des levures.

Conterno et al. (2006) ont trouvé que l'utilisation du glycérol comme seule source de carbone était controversée selon les isolats testés. La non consommation serait principalement due aux conditions de croissance de la levure, c'est-à-dire qu'une semi-anaérobiose entraînerait une non utilisation du glycérol.

2.4.1.2 Synthèse d'acide acétique

La production d'acide acétique, qui peut également avoir lieu sous condition de culture en aérobiose est réalisée grâce à l'utilisation de l'acetyl-CoA synthétase qui est la seule source d'acetyl-CoA cytosolique, un composant impératif pour la biosynthèse d'acides gras (Flikweert et al., 1996; Van Den Berg et Steensma, 1995).

Les espèces de *Brettanomyces* sont également bien connues pour avoir la capacité d'affecter la qualité du vin négativement par la production d'acide acétique, qui constitue plus de 90% de l'acidité volatile du vin (Van der Walt et Van Kerken, 1958). Une concentration élevée peut être préjudiciable sur la qualité du vin. Cette augmentation en acide acétique a été associée à des fermentations arrêtées ou languissantes (Bisson, 1999). Cette levure est capable de produire, d'accumuler et ensuite de consommer de fortes concentrations en acide acétique en conditions aérobies.

2.4.1.3 Métabolisme des sucres

Cette levure est capable de métaboliser différents sucres comme sources de carbone telles que le glucose, fructose, maltose et mannose (Conterno et al., 2006; Dias et al., 2003).

Un milieu riche en sucres peut inhiber le métabolisme respiratoire chez la levure en exerçant une répression sur les enzymes de la respiration indépendamment de la présence en oxygène dans le milieu. Ce phénomène est très important en œnologie. *B. bruxellensis* peut fermenter les sucres permettant la production d'éthanol, même sous condition d'aérobiose où la respiration cellulaire est en principe également possible. Les cellules *B. bruxellensis* sont donc Crabtree positive (Barbin, 2006; Gilis, 1999). Cet effet supporte également la stratégie des levures à produire premièrement l'éthanol pour prévenir la croissance de microorganismes compétitifs et puis elles peuvent utiliser cet éthanol pour la respiration cellulaire lorsque le glucose n'est plus présent dans le milieu (De Deken, 1966).

2.4.2 Sources azotées

Les connaissances sur l'utilisation des composés azotés et sur les sources azotées préférées sont limitées (de Barros Pita et al., 2013; Childs et al., 2015). Cependant il est connu que *B. bruxellensis* utilise différentes sources d'azote et que cette levure a de faibles besoins en azote en conditions d'aérobiose (Aguilar-Uscanga et al., 2000; Conterno et al., 2006; Morneau et al., 2011). En conditions d'anaérobiose stricte, une souche est incapable de croître dans un milieu sans acide aminé. D'autres études montrent que les milieux permettant la croissance de cette levure doivent contenir des extraits de levure ou des casamino-acides (Ciani et Ferraro, 1997; Rozpędowska et al., 2011; Uscanga et al., 2003). Une étude de Blomqvist (2011) a révélé que les acides aminés : lysine, histidine, arginine, asparagine, acide aspartique, acide glutamique et

alanine sont tous impliqués dans la croissance de *B. bruxellensis* en conditions d'anaérobiose. Récemment il a été montré que l'ammonium, les nitrates et certains acides aminés pouvaient être utilisés par *B. bruxellensis* (de Barros Pita et al., 2013; Blomqvist, 2011; Blomqvist et al., 2012; Conterno et al., 2006; Galafassi et al., 2013). Cependant, pour Gaunt et al. (1988), l'ammonium n'a pas d'effet sur la croissance de cette levure et Aguilar-Uscanga et al. (2000) montrent que le sulfate d'ammonium à des concentrations supérieures à 2 g/L peut potentiellement inhiber cette croissance. Chez certaines espèces levuriennes, *B. bruxellensis* inclus, le nitrate est converti en ammonium grâce à deux réactions successives catalysées par la nitrate réductase et la nitrite réductase. Les concentrations des nitrates et nitrites sont très faibles en milieu vin, alors que l'ammonium est très abondant dans le moût de raisin. Il a été démontré que l'assimilation des nitrates annule l'effet Custer (fermentation du glucose plus rapide en présence d'oxygène qu'en anaérobiose), permettant probablement un métabolisme fermentaire plus important (Galafassi et al., 2013). Cependant, contrairement à cette précédente étude, Borneman et al. (2014) ont trouvé que deux souches de *Brettanomyces* isolées de vins australiens n'étaient pas capables d'utiliser les nitrates.

Beaucoup d'acides aminés sont disponibles dans le vin à la fin de la FA, et il est aussi noté une augmentation de la teneur en acides aminés dans le vin au cours de l'élevage notamment par le relargage de ces derniers suite à l'autolyse des levures responsables de la FA (Lehtonen, 1996; Perrot et al., 2002; Valero et al., 2003). Concernant la proline, deux études par van Zyl (1962) et Blomqvist (2011) présentent des résultats indiquant que la proline n'a pas d'effet sur la croissance de *B. bruxellensis*. Cela est pourtant contradictoire avec d'autres études. Conterno et al. (2006) et Crauwels et al. (2015) trouvent en effet que *B. bruxellensis* peut utiliser les acides aminés, principalement la proline et l'arginine. Cependant, les auteurs n'ont pas indiqué les conditions de croissance (aérobiose ou anaérobiose).

2.4.3 Production de phénols volatils

La formation de phénols volatils a été démontrée comme étant le résultat de la transformation enzymatique des acides phénols cinnamiques présents durant l'élaboration du vin (Chatonnet et al., 1992a; Heresztyn, 1986b). Ces acides phénols (acides *p*-coumarique, férulique et caféique) sont naturellement présents dans le jus de raisin et dans le vin. Leur origine est le raisin où ils

sont présents généralement sous forme d'esters avec l'acide tartrique (Dugelay et al., 1993): il est retrouvé ainsi les acides coutarique, fertarique et caftarique. L'action d'enzymes avec une activité estérase libère ces acides faibles dans leurs formes libres (Gerbaux et al., 2002). Ces acides phénols peuvent inhiber la croissance de nombreux microorganismes (Barthelmebs et al., 2001; Stead, 1995; Zaldivar and Ingram, 1999). *B. bruxellensis* pourrait convertir ces acides phénols toxiques en phénols volatils afin de détoxifier le milieu (hypothèse discutée actuellement mais non prouvée scientifiquement). Les acides hydroxycinnamiques sont décarboxylés en vinylphénols (4-vinylphénol, 4-vinylgàïacol et 4-vinylcatéchol) par la cinnamate décarboxylase. Ces derniers sont ensuite réduits en éthylphénols (4-éthylphénol, 4-éthylgàïacol et 4-éthylcatéchol) par l'action de la vinylphénol réductase (Chatonnet et al., 1992a; Heresztyn, 1986b; Hesford et al., 2004; Tchobanov et al., 2008). En vin rouge, les seuils de perception de 770 et 426 µg/L ont été rapportés pour respectivement les vinylphénols et pour les éthylphénols (Chatonnet et al., 1992a, 1993). La variété des raisins utilisés affecterait cependant la perception sensorielle des éthylphénols. Physter et Mills (2004) ont ainsi indiqué que le seuil de détection était plus élevé dans les vins issus de raisins du cépage Cabernet Sauvignon que dans les vins élaborés avec le cépage Tempranillo.

Des souches de *Pichia guillermondii* ont également été déclarées comme produisant des quantités considérables d'éthylphénols dans le moût de raisin (Dias et al., 2003). De nombreuses études ont été réalisées pour élucider le rôle des phénols volatils et la formation du « caractère *Brettanomyces* » en vin (Chatonnet et al., 1997, 1995, 1992; Coulter et al., 2003; Dias et al., 2003; Edlin et al., 1995; Francis et Newton, 2005; Heresztyn, 1986a; Hesford et al., 2004; Licker et al., 1998).

D'autres levures présentes dans le vin, comme *S. cerevisiae*, *Pichia* spp., *Torulaspota* spp. et *Zygosaccharomyces* spp. peuvent aussi produire du 4-vinylphénol mais elles ne peuvent pas réduire ce composé en 4-éthylphénol (Dias et al., 2003). Différentes souches de *Brettanomyces* ont également montré de grandes différences dans leur production de phénols volatils (Joseph et Bisson, 2004).

2.4.4 Production de tétrahydropyridines

Un autre défaut du vin qui peut rendre les arômes et le goût des vins inacceptables est le « goût de souris ». Ce défaut en vin a été reporté par Heresztyn (1986b) qui a isolé et caractérisé les composés responsables de cet arôme désagréable à partir de vins contaminés par des microorganismes appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Brettanomyces*. Trois composés chimiques ont été identifiés: 2-acétyltétrahydropyridine (ATHP), 2-éthyltétrahydropyridine (ETHP) et 2-acétyl-pyrroline (APY) (Grbin et al., 1995; Heresztyn, 1986b).

Les levures appartenant au genre *Brettanomyces* sont capables de produire seulement les deux premiers composés, ATHP et EHP. Le premier composé semble avoir un seuil de perception dans l'eau 100 fois inférieur à celui de l'ETHP, c'est-à-dire à 1,6 µg/L (Teranishi et al., 1975). Dans des vins altérés, l'ATHP a été déterminé à des valeurs de 4,8 à 106 µg/L (Grbin et al., 1995). L'acide aminé L-lysine est essentiel pour la formation de ces deux composés (Grbin et al., 1995; Grbin et Henschke, 2000; Heresztyn, 1986b). L'éthanol est également un précurseur nécessaire pour que le défaut se produise en vin (Snowdon et al., 2006). De plus, l'oxygène a été démontré comme ayant un effet stimulant sur la production d'ATHP et EHP (Grbin, 1998) mais cela est probablement dû à une plus grande biomasse de *Brettanomyces* en condition aérobie. Le « goût de souris » se produit peu fréquemment en vin pour des raisons non élucidées actuellement.

2.4.5 Dégradation des anthocyanes

Brettanomyces peut, dans des situations favorables, hydrolyser la liaison anthocyanidines-glucose et libérer ainsi du glucose (Mansfield et al., 2002). Les vins contaminés avec *Brettanomyces* ont souvent une couleur dépréciée du fait de cette perte en anthocyanes (forme stable).

2.5 Facteurs de développement de *B. bruxellensis*

2.5.1 Facteurs physicochimiques

2.5.1.1 Influence de l'éthanol

La plupart des souches de *Brettanomyces* montrent une forte résistance à l'éthanol, représentant un caractère crucial pour leur survie en environnement fermentaire. Cependant, en général, *Brettanomyces* est légèrement plus sensible comparée à la plupart des souches *S. cerevisiae*

(Barata et al., 2008). Les expérimentations utilisant des milieux synthétiques indiquent que 14,5% - 15% (v/v) d'éthanol est reconnue comme la limite supérieure qui permet la croissance de *Brettanomyces* en vin. Cependant, ce caractère dépend de la souche et des facteurs environnementaux, tels que le pH et la concentration en SO₂ libre (Sturm et al., 2014). De plus, différents niveaux de stress éthanol affectent la production d'arômes par *Brettanomyces*. Conterno et al. (2013) ont ainsi montré que la synthèse de composés spécifiques, tels que les esters éthyliques, le phényléthanol et le 4-éthylgàïacol, est augmentée en réponse à de hautes concentrations en éthanol, bien que la croissance des cellules soit limitée.

2.5.1.2 Influence de la température

L'intervalle de l'optimal de croissance pour *Brettanomyces* est compris entre 25°C et 28°C (Brandam et al., 2008; Fugelsang and Edwards, 2007; Zuehlke and Edwards, 2013). Le rendement en éthanol, la productivité et la croissance sont légèrement influencés par la température (Blomqvist et al., 2010; Brandam et al., 2008; Yakobson, 2009).

2.6 Dénombrement et Identification

2.6.1 Dénombrement sur milieux sélectifs

Les méthodes de microbiologie conventionnelle telles que la croissance sur milieu de culture sélectif ou les tests biochimiques ont été utilisées pour isoler et identifier les espèces ou genres durant plusieurs décennies.

Le développement d'un milieu sélectif pour l'isolement de *Brettanomyces* a été fait par Rodrigues et al. (2001). Ils ont testé différents milieux de cultures tels que:

- mannitol Salt Agar,
- kanamycin Aesculin Azide Agar Base,
- KF *Streptococcus* Agar,
- YM supplémenté avec de la fuchsine (5 g/L peptone, 10 g/L glucose, 3 g/L extrait de levure, 3 g/L extrait de malt, 20 g/L agar)
- GYP (20 g/L glucose, 5 g/L extrait de levure, 10 g/L peptone et 20 g/L agar + 4 g/L de carbonate de calcium) avec différentes sources en carbones (glucose, éthanol et galactose ; pH 5,4),

- YNB (Difco) supplémenté avec différentes sources de carbones (glucose, éthanol, glycérol et plusieurs sources d'acides organiques ; pH 5,4),
- WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient) (Difco),
- GYP (20 g/L glucose, 5 g/L extrait de levure, 10 g/L peptone et 20 g/L agar + 4 g/L de carbonate de calcium) avec différentes concentrations en antibiotiques (5-fluorocytosine, fluconazole, nystatine, econazole, ketoconazole, miconazole et cycloheximide).

Certains de ces milieux ont été supplémentés avec de l'acide *p*-coumarique et du vert de bromocrésol.

De cette étude, le milieu appelé DBDM (*Dekkera/Brettanomyces* Differential Medium) a été démontré comme étant capable de mesurer une population de levures cibles inférieure à 1% à partir d'une population totale microbienne, en combinaison avec la méthode du nombre le plus probable (NPP). Avec une base contenant de l'azote (YNB : Yeast Nitrogen Base), ce milieu contient aussi 2 agents antimicrobiens (éthanol et cycloheximide), un indicateur de pH (vert de bromocrésol) indiquant l'acidification du milieu et un substrat (acide *p*-coumarique). Ce dernier composé a été ajouté afin de mettre en évidence une odeur phénolée désagréable qui confirme la présence de *Brettanomyces*.

Le développement d'un milieu sélectif qui favorise la détection de *Brettanomyces* a suivi les travaux de Rodrigues et al. (2001). Le milieu WLN a été axé sur le développement d'un système de détection simple de la levure *Brettanomyces* qui pouvait être utilisé en routine dans l'industrie du vin (Couto et al., 2005). Les milieux liquides ont été décrits comme ayant une fonction de ressuscitation pouvant être bénéfique pour de nombreux microorganismes tout en réduisant la croissance des champignons (Loureiro et Malfeita-Ferreira, 2006). Cependant, l'utilisation de cycloheximide inhibant la croissance des cellules eucaryotes peut entraîner une inhibition de croissance de certaines souches de *B. bruxellensis* du raisin et du vin alors que cette levure est connue pour être résistante à ce composé (Barnett et al., 2000; Morneau et al., 2011). L'ajout de ce composé permet donc une spécificité du milieu de culture afin que la présence de *S. cerevisiae* n'influence pas le dénombrement après incubation. Cependant, cette inhibition est partielle puisqu'un développement peut avoir lieu avec le temps (semi-spécificité). L'étude de Morneau et

al. (2011) montre que l'ajout de vin rouge stérile dans le milieu de culture permettrait d'améliorer le développement des colonies par la présence de nutriments (non déterminés à ce jour).

Comme décrit précédemment, la présence de *Brettanomyces* sur le raisin est remarquablement faible, c'est pourquoi Renouf et Lonvaud-Funel (2007) ont proposé l'utilisation d'un milieu d'enrichissement afin de palier à ce problème et obtenir ainsi une bonne détection de *Brettanomyces* sur la surface des baies de raisin. Cependant, leur faible taux de croissance et leur besoin en nutriments complexes demandent un temps d'incubation supérieur à deux semaines (Rodrigues et al., 2001). Cette période d'incubation est généralement trop longue pour sélectionner spécifiquement l'espèce *Brettanomyces* au sein d'une large diversité microbienne de la baie de raisin pouvant présenter des taux de croissance plus rapides que celui de *B. bruxellensis* (Oelofse et al., 2008).

2.6.2 Etat VNC

Bien que de nombreuses techniques culture-dépendantes soient disponibles pour déterminer la présence de cette levure indésirable durant le processus de vinification, dans de nombreux cas *Brettanomyces* est indétectable, alors que le produit final est affecté par la présence d'odeurs phénolées causées par la présence de cette levure (Laforgue et Lonvaud-Funel, 2012; Serpaggi et al., 2012). Ce phénomène a été expliqué par l'aptitude des cellules *Brettanomyces* d'entrer en état viable mais non cultivable (VNC). Cet état est caractérisé par une incapacité des cellules à se développer sur milieu de culture, même si elles sont encore en vie avec une activité métabolique et des fonctions cellulaires maintenues (Agnolucci et al., 2010; Divol et Lonvaud-Funel, 2005; Du Toit et al., 2005). Par ailleurs, certaines études affirment que les cellules de *B. bruxellensis* en état VNC continuent de produire du 4-éthylphénol et 4-éthylgâïacol (Serpaggi et al., 2012) alors que d'autres affirment le contraire (Agnolucci et al., 2010; Zuehlke et Edwards, 2013).

Bien que l'entrée en état VNC soit un sérieux problème pour gérer la stabilité microbiologique et la qualité du produit fermenté (Li et al., 2014; Millet et Lonvaud-Funel, 2000), peu d'études ont été réalisées sur l'état VNC de ces levures (Agnolucci et al., 2010; Du Toit et al., 2005; Salma et al., 2013; Serpaggi et al., 2012; Zuehlke et Edwards, 2013). Dans le domaine de la vinification, le dioxyde de soufre (SO₂), agent antimicrobien utilisé pour la préservation des aliments, induit l'état VNC chez *B. bruxellensis* (Agnolucci et al., 2014, 2010; Du Toit et al., 2005; Serpaggi et al., 2012; Zuehlke et Edwards, 2013). Serpaggi et al. (2012) ont démontré que les souches

pouvaient « ressusciter », retrouvant alors une cultivabilité, par augmentation du pH éliminant le SO₂ moléculaire, forme active du SO₂ présent dans le milieu. Effectivement, en microbiologie, la « ressuscitation » peut s’opérer lorsque le stress, induisant l’état VNC, est levé (Du Toit et al., 2005; Li et al., 2014; Oliver, 2010). Concernant la variabilité intraspécifique, Zuehlke et Edwards (2013) ont essayé de trouver la bonne combinaison de SO₂ moléculaire et la température afin de limiter la croissance de *Brettanomyces*. Ils ont décrit une certaine diversité de cultivabilité parmi 3 souches de *B. bruxellensis*. Récemment, Agnolucci et al. (2014) ont analysé par marquage de vitalité (bleu de trypan) 7 souches représentatives de 85 isolats. Ils ont indiqué qu’une concentration en SO₂ moléculaire supérieure à 1 mg/L induit un état VNC à des niveaux différents après 24 h d’exposition.

2.6.3 Identification

2.6.3.1 Sans quantification

De nombreuses techniques utilisant principalement la biologie moléculaire ont été développées afin de permettre la mise en évidence de la présence de *Brettanomyces* dans le milieu et un dénombrement semi-quantitatif peut être effectué avec certaines de ces méthodes.

Tableau 3

Méthodes permettant la discrimination de B. bruxellensis selon son genre, son espèce ou la souche présente.

Spécificité des méthodes	Méthodes	Références
Identification du genre	Caryotypage RFLP	Mitrakul et al. (1999)
	PCR-ITS-RFLP	Curtin et al. (2007)
	LAMP	Hayashi et al. (2007)
Identification de l'espèce	PCR-ITS-RFLP	Dias et al. (2003); Esteve-Zarzoso et al. (1999)
	PCR-RAPD	Miot-Sertier et Lonvaud-Funel (2007)
Discrimination entre les souches	Nested PCR	Ibeas et al. (1996)
	Restriction PCR-mtDNA	Agnolucci et al. (2009); Martorell et al. (2006)
	PCR-RAPD	Agnolucci et al. (2009); Mitrakul et al. (1999); Martorell et al. (2006)
	Microsatellites	Albertin et al. (2014)
	PCR-AFLP	Curtin et al. (2007)
	PCR-ISS	Vigentini et al. (2011); Oelofse et al. (2009)

2.6.3.2 Avec quantification

2.6.3.2.1 PCR en temps réel

Plusieurs études ont mis en place des protocoles permettant la quantification par PCR en temps réel de *B. bruxellensis* en vin telles que les études de Agnolucci et al. (2007), Andorrà et al., (2010), Delaherche et al. (2004), Phister et Mills (2003), Salinas et al. (2009), Tessonnière et al., (2009), Willenburg et Divol (2012) et Zott et al. (2010). Cependant, la croissance des microorganismes en vin modifie l'efficacité et la fiabilité de l'extraction de l'ADN puisque des polyphénols semblent être adsorbés au niveau de la paroi des cellules (Morata et al., 2003, 2004; Razmkhab et al., 2002). Les composés comme les tanins, les polysaccharides et les pigments peuvent inhiber l'amplification de l'ADN (Rossen et al., 1992; Wilson, 1997). Or, une faible efficacité d'extraction et d'amplification peut conduire à des résultats faux-négatifs.

Aujourd'hui, différents kits commerciaux peuvent également être utilisés en contrôle afin de permettre la quantification de cette levure en milieu vin.

2.6.3.2.2 Epifluorescence et cytométrie en flux

2.6.3.2.2.1 *Marqueur de viabilité*

Gerbaux (2007) a développé pour la matrice vin une méthode mettant en évidence la viabilité cellulaire en utilisant un fluorochrome couplé à la cytométrie en flux. Cependant cette technique n'est pas spécifique, donc une surestimation de la population peut être faite en utilisant cette méthode si différents genres levuriens sont présents. De nombreux fluorochromes peuvent être utilisés afin de déterminer l'état physiologique des microorganismes présents (voir Revue rédigée au cours de cette thèse et insérée partie 3. de ce chapitre).

2.6.3.2.2.2 *Sondes FISH*

Des sondes oligonucléiques ou peptidiques ont été développées afin de quantifier spécifiquement *Brettanomyces* (Dias et al., 2003; Millet et Lonvaud-Funel, 2000; Röder et al., 2007; Stender et al., 2001). Le plus souvent utilisé en épifluorescence, un protocole a été développé afin de quantifier *Brettanomyces* directement en vin rouge en utilisant la cytométrie en flux (Serpaggi et al., 2010). Ce protocole permet une quantification en 48 h (voir Revue rédigée au cours de cette thèse et insérée partie 3. de ce chapitre).

2.6.3.2.2.3 Anticorps

Bretta Test, développé par le laboratoire privé de recherche Amarok Biotechnologies et distribué par le laboratoire Vect'oeur, est le premier test de laboratoire permettant de détecter spécifiquement la levure *Brettanomyces* par des anticorps spécifiques et de donner en même temps leur état de viabilité. Les tests réalisés en laboratoire et en conditions réelles ont confirmé la spécificité et l'efficacité de leur méthode d'analyse pour une prévention et un suivi des procédés de production des vins et des cidres. Le résultat serait disponible après 2 h.

2.6.3.2.3 Capteur d'ADN chimioluminescent

Cecchini et al. (2012) ont développé une technique répétable et rapide de chimioluminescence détectée par un capteur à fibre optique. Ils ont développé des sondes fluorescentes ciblant les séquences ITS (Internal Transcribed Spacer) de *Brettanomyces bruxellensis*. Des corrélations entre la population de *B. bruxellensis* présente et la chimioluminescence détectée ont été effectuées.

3 Utilisation de la cytométrie en flux pour quantifier et déterminer l'état physiologique des microorganismes du vin

Food Microbiology 62 (2017) 221–231



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm



Review

Application of flow cytometry to wine microorganisms



Cédric Longin^{*},¹, Clément Petitgonnet¹, Michèle Guilloux-Benatier, Sandrine Rousseaux, Hervé Alexandre

Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France; Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Equipe VAIMIS, rue Claude Ladrey, BP 27877, F-21078 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 February 2016
Received in revised form
20 July 2016
Accepted 11 October 2016
Available online 18 October 2016

Keywords:

Flow cytometry
Wine yeasts
Wine bacteria
Enumeration
Identification
Physiological state

ABSTRACT

Flow cytometry (FCM) is a powerful technique allowing detection and enumeration of microbial populations in food and during food process. Thanks to the fluorescent dyes used and specific probes, FCM provides information about cell physiological state and allows enumeration of a microorganism in a mixed culture. Thus, this technique is increasingly used to quantify pathogen, spoilage microorganisms and microorganisms of interest. Since one decade, FCM applications to the wine field increase greatly to determine population and physiological state of microorganisms performing alcoholic and malolactic fermentations. Wine spoilage microorganisms were also studied. In this review we briefly describe FCM principles. Next, a deep revision concerning enumeration of wine microorganisms by FCM is presented including the fluorescent dyes used and techniques allowing a yeast and bacteria species specific enumeration. Then, the last chapter is dedicated to fluorescent dyes which are used to date in fluorescent microscopy but applicable in FCM. This chapter also describes other interesting “future” techniques which could be applied to study the wine microorganisms. Thus, this review seeks to highlight the main advantages of the flow cytometry applied to wine microbiology.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Flow cytometry: an overview and principles	222
1.1. Fluidic system	222
1.2. Optical system	222
1.3. Electronic system	222
1.4. Flow cytometry for enological studies	222
2. Enumeration of wine microorganisms by FCM	222
2.1. Microorganism enumeration and physiological state analysis by flow cytometry	223
2.1.1. Cell vitality	224
2.1.2. Cell viability	224
2.1.3. Viability and vitality double staining	225
2.1.4. Viable But Non Culturable (VBNC) state	226
2.1.5. Cell cycle analysis	227
2.1.6. Membrane potential	227
2.1.7. Intracellular reactive oxygen species (ROS)	227
2.1.8. Intracellular lipid content	227
2.1.9. Intracellular pH	227
2.2. Specific enumeration of wine microorganisms	227
2.2.1. Using specific antibodies	227
2.2.2. Using fluorescent <i>in situ</i> Hybridization (FISH)	228
2.2.3. Using fluorescent strains of microorganisms	228

^{*} Corresponding author.

¹ These authors contributed equally to this work.

3. Perspectives: other dyes used with wine yeasts and bacteria applicable to flow cytometry	228
3.1. Fluorescent dyes	228
3.1.1. Membrane fluidity	228
3.1.2. Viable But Non Cultivable (VBNC) state	228
3.1.3. Using FISH for specific LAB and yeast identification and enumeration	228
3.2. Other interesting "future" techniques	229
Acknowledgments	229
References	230

1. Flow cytometry: an overview and principles

Flow cytometry (FCM) is defined as the study of isolated cells in a liquid flow. It is an individual, quantitative and qualitative method used to characterize particles in liquid suspension. Flow cytometry is a powerful technique used to analyze multiple parameters of individual cells within heterogeneous populations. Several reviews and books have been dedicated to the principle of flow cytometry and given numerous details (Díaz et al., 2010; Longobardi-Givan, 2001; O'Neill et al., 2013). In the sake of brevity, a flow cytometer is composed of three main parts: fluidic, optical, and, electronic systems (Fig. 1).

1.1. Fluidic system

The fluidic component is composed of a flow chamber that separates and aligns particles (Fig. 1). Most flow cytometers accomplish this by injecting the sample stream containing the cells into a flowing stream of sheath fluid or saline solution. The sheath liquid undergoes gradual acceleration which stretches the liquid sample and thus aligns the cells in the jet center (Díaz et al., 2010). Then the cells pass through the light source with the refraction or scattering of light at all angles. The light sources may be a laser, arc lamp or light emitting diode (LED). Most flow cytometers use a laser as light source. A laser provides a bright and consistent light source with a narrow, specific and well-defined wavelength. Many different types of lasers are currently available and this number is increasing. Some commonly used lasers include argon, krypton, helium-neon, cadmium helium lasers and Yag lasers (Shapiro, 2003).

1.2. Optical system

The light emitted from the cells after they are irradiated in the flow chamber is directed to a detector array by a complex system of mirrors and filters which compose the optical system (Fig. 1). Forward scatter (FSC), or low-angle light scatter, is the amount of light scattered in the forward direction when the laser light strikes the cell (Díaz et al., 2010). The magnitude of forward scatter is roughly proportional to the size of the cell and this data can be used to quantify this parameter. Moreover, a cell traveling through the laser beam will scatter light at all angles. Light scattering at larger angles, for example to the side, is caused by granularity and structural complexity inside the cell (Díaz et al., 2010). This side-scattered (SSC) light is focused through a lens system and collected by a separate detector, usually located 90° from the laser beam's path. The characteristics of front and side light scattering can be used to identify cell types that differ by their size and granularity. A second focusing lens is used to direct the light rays to a set of filters that separate the various wavelengths present. High-pass filters allow light only above a certain wave frequency while low pass filters allow light only below a certain frequency. Together, these two

filters form a band pass filter. In a population of labelled cells, cells cross the path of the laser and generate a fluorescence signal. The fluorescent light is then directed to the appropriate detector.

1.3. Electronic system

Light which passes through an optical system will be converted into electronic signals generated by photodiodes and photo-multiplier tubes (PMT) and collected to enable data acquisition and analysis (Fig. 1). This is accomplished through photodiodes (frontal dispersion; FSC) and PMT for fluorescent rays and signals associated with side scatter light (SSC). Some modern flow cytometers can have up to 12 PMT, though this number has not increased with the development of new technologies.

1.4. Flow cytometry for enological studies

Most flow cytometry protocols applied in enology that will be described in details in the following sections concern detection and enumeration of wine microorganisms, defined respectively as presence/absence of microorganisms and determination of the population level. Using different dyes coupled to flow cytometry, physiological analysis of wine yeast and bacteria could be performed. Viability could be assessed which corresponds to living cells which are the sole able to perform alcoholic fermentation. However, viable cells could have a weak activity which will impact the alcoholic fermentation rate, for this reason it is interesting to measure the yeast vitality which reflects yeast activity. Finally, the presence of Viable But not Culturable (VBNC) cells could also be assessed. This specific physiological state is characterized by the inability of the cells to grow in a culture media, even though they are still viable and maintain a detectable metabolic activity. Such physiological state is important to monitor, since in wine conditions it could lead to future wine spoilage as described below.

Thanks to these different physiological characteristics, a precise monitoring of the alcoholic fermentation and the malolactic fermentation can be performed. The first fermentation is conducted by yeasts which convert sugars such as glucose, fructose into cellular energy, producing ethanol and carbon dioxide. The second fermentation is achieved by bacteria. This biological process converts malic acid to lactic acid and carbon dioxide into cells, leading to an increase of the wine pH value.

2. Enumeration of wine microorganisms by FCM

Wine is a complex matrix containing many compounds and microorganisms such as yeasts, lactic acid bacteria (LAB) and sometimes acetic acid bacteria (AAB). The yeast responsible for alcoholic fermentation (AF) is mainly *Saccharomyces cerevisiae*. Non-*Saccharomyces* yeasts are also present on grape berries, in grape must and during AF. Moreover, yeasts such as *Brettanomyces bruxellensis* and *Candida vini*, considered as spoilage yeasts, may be

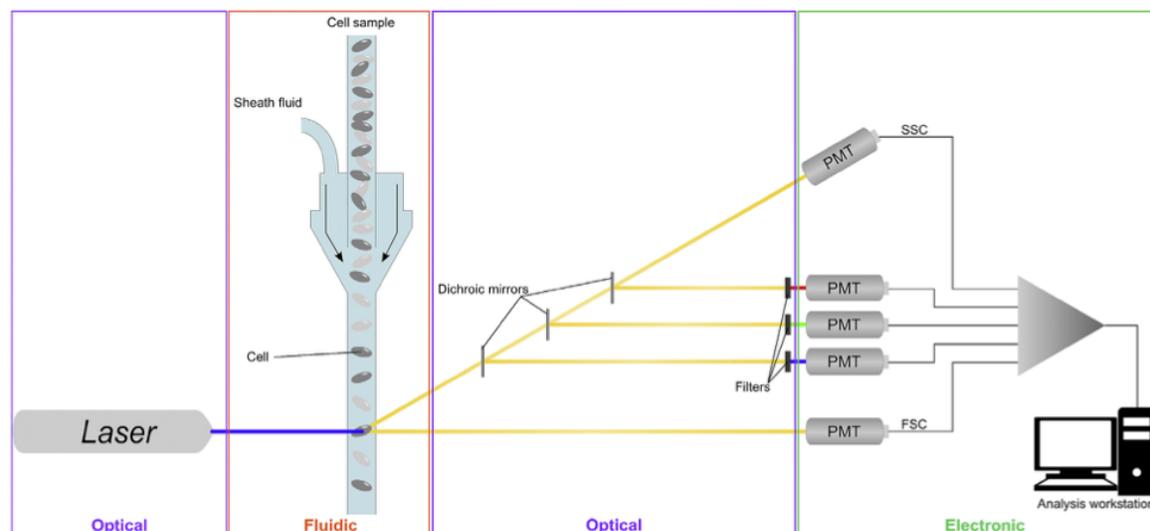


Fig. 1. Flow cytometer composed of fluidic, optical and, electronic systems.

found during the winemaking process. Regarding bacteria, the most abundant LAB in wine are *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus damnosus* and also species include *O. oeni* and *L. brevis* (Muñoz et al., 2011). *O. oeni* is mainly known to perform malolactic fermentation (MLF) while AAB such as *Acetobacter* spp., *Gluconobacter* spp., *Gluconacetobacter* spp. can also be found throughout the winemaking process (Guillamón and Mas, 2011). Winemakers must know the populations performing fermentations and the concentration of spoilage microorganisms in order to make quality wine. Different techniques are available to detect and/or quantify these microorganisms in wine and during the fermentation steps.

One of them consists in spreading a wine sample on selective agar plates to enumerate cells and obtain information on the microorganisms present, but this technique takes too long to obtain results (generally between 2 and 10 days) and cannot detect Viable But Non-Culturable (VBNC) cells which are common in wine (Bouix and Ghorbal, 2013; Bouix and Leveau, 2001; Branco et al., 2012; Salma et al., 2013; Serpaggi et al., 2012).

Microscopy is another technique used to enumerate cells using a specific chamber, like Malassez or Thoma chambers (Bouix and Leveau, 2001), but it is a long, fastidious and subjective method. Nevertheless, cells can be stained with dyes to determine specific cell functions or with species-specific fluorescent-labelled oligonucleotide probes and visualized by the Direct Epifluorescence Filter Technique (DEFT) using a fluorescent microscope. This technique is quite long, fastidious and the results are also subjective (Bruetschy et al., 1994).

In addition, techniques based on Polymerase Chain Reaction (PCR), like quantitative PCR (qPCR) can also detect and quantify microorganisms. Indeed, thanks to oligonucleotide primers able to bind specifically to a target DNA sequence and to the fluorescence emitted by DNA intercalant (like SybrGreen) or fluorescent probes (like Taqman) in each cycle of PCR, this technique give a high specific detection and enumeration of a target microorganism. However, this technique requires a DNA extraction step before qPCR and the extraction yield can be perturbed by complex wine compositions, especially those of red wines which contain a large quantity of polyphenols. These molecules can interfere with the cell membrane (Morata et al., 2003; Razmkhab et al., 2002), influencing

cell lysis during DNA extraction and leading to a low DNA extraction yield. Moreover, DNA amplification problems are often encountered due to inhibitory substances such as tannins, polysaccharides and pigments (Rossen et al., 1992; Wilson, 1997).

The FCM method allows both the detection and enumeration of microorganisms with rapidity and high specificity. Firstly, FCM can be used to monitor the physiological state of cells during AF or MLF, using specific dyes. Furthermore, FCM can be used to specifically detect and quantify spoilage microorganisms like AAB and certain yeast species directly in finished wine. Recent advances in FCM make these alternative tools relevant compared to other methods. In addition to its capacity to specifically quantify microorganisms, this technique may provide information on the physiological state of the cells. Thus the aim of this review is to show the potential of FCM, its effectiveness and describe its applications to the winemaking process and wine microbiological controls.

2.1. Microorganism enumeration and physiological state analysis by flow cytometry

Yeast and bacteria enumeration may be performed by flow cytometry. According to the wine studied, especially red wine, enumeration can be more difficult due to the increase of background noise, which may be confounded with bacteria and sometimes even with yeasts. Nowadays, many fluorescent dyes (permeant DNA stains) are commercially available and allow microorganism staining to facilitate detection and enumeration, even in the case of considerable background noise. These fluorescent dyes include SYTO dyes like SYTO 9, SYTO 13 and SYTO 17 and they are essentially non-fluorescent until they bind to nucleic acids. Also used are DAPI and SYBR dyes which are already fluorescent; their fluorescence improves when they are bound to DNA (Díaz et al., 2010). Using cellular autofluorescence for a cell population can give different results according to the medium in which it is grown. Therefore, medium composition appears very important and several studies on wine coupled with FCM have been performed in different matrixes, such as in natural grape musts, synthetic musts, synthetic wines or directly in wines (white and red wines). The authors of other studies performed their experiments in growth medium. Table 1 references all the matrixes used in FCM

with the enological applications. The differences between the synthetic media cited in this review are given in Table 2.

2.1.1. Cell vitality

In order to perform wine fermentations, yeasts and bacteria must be alive and metabolically active. Thus FCM is an appropriate technique for monitoring AF performed mainly by *S. cerevisiae*, or MLF performed mainly by *O. oeni*. Vitality dyes determine life essential functions such as enzyme activity. Fluorescein Di-Acetate (FDA) is a well-known dye commonly used in many applications due to its quick and easy staining protocol and allows obtaining results on cell vitality, such as that of *S. cerevisiae* in synthetic wine (Malacrino et al., 2001; Salma et al., 2013), in Pinot Noir grape must and red wine (Malacrino et al., 2001), and in both red and white wines (Gerbaux and Thomas, 2009) during AF. Indeed, FDA staining reflects cell enzyme activity through esterase activity, highlighting the metabolic activity of cells.

2.1.1.1. Yeasts. This dye can rapidly inform on the cell vitality of a population in single or mixed cultures in wine, as well as during AF and MLF. Malacrino et al. (2001) showed a good correlation between plate counts and the enumeration of *S. cerevisiae* stained with FDA. Likewise, cFDA is another marker of vitality widely used in synthetic must (Bouchez et al., 2004; Bouix and Leveau, 2001; Monthéard et al., 2012) and relies on mechanism similar to FDA. Good correlation between plate counts of *S. cerevisiae* and cFDA staining was also demonstrated by Bouix and Leveau (2001). cFDA has the particularity of being better retained in cells as this compound is more negatively charged than FDA, whose enzymatic products, fluorescein, can be released from the cell to the buffer, leading to a decrease in the fluorescent signal (Bouix and Leveau, 2001; Prosperi et al., 1986). Another fluorescent dye recently used in fermentation monitoring in synthetic wine is [2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenylquinolinium iodide], also called FUN-1, which can inform on both metabolic activity and membrane integrity (Salma et al., 2013). Indeed, this dye is able to enter through cell walls by passive diffusion and emits a yellow-green cytoplasmic fluorescence. But the real interest of FUN-1 dye is the formation of cylindrical intra-vacuolar structures (CIVS) in yeast (Henry-Stanley et al., 2004), which emit a red fluorescence, resulting in the decrease of the cytoplasmic green fluorescence. CIVS formation can only be achieved if the cells present non-damaged membranes and active metabolism. Thus dead cells are stained yellow-green and live cells (i.e. with an intact membrane and metabolically active) are stained red, resulting in a double-staining method with only one dye.

2.1.1.2. Bacteria. Regarding bacteria, Malacrino et al. (2001) compared the enumeration of *O. oeni* in red wine by FCM versus plate counts on AGB. They tested four fluorescent dyes: Rhodamine 123; Calcein acetoxymethyl ester (Calcein-AM); 2', 7'-bis-carboxyethyl-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF-AM) and FDA. They showed that the fluorescence intensity of labelled malolactic bacteria varies considerably according to the dye used and the strain tested. They found that the majority of *O. oeni* strains studied could be stained with FDA. However, 40% of *O. oeni* strains were fluorescent in 10–15 min, 30% in 60 min, while two strains could not be labelled at all. The ability of FDA to stain viable cells is based on its cleavage in living cells, but it has been reported that fluorescein can leak out of the cells after it has been cleaved (Diaper and Edwards, 1994). This problem leads to a significant difference for *O. oeni* enumeration in Bardolino wine between both enumeration methods, i.e. plate counts and FCM (Malacrino et al., 2001). The study by Salma et al. (2012) showed that *O. oeni* enumeration using FDA staining as vitality marker is possible in white wine

compare to plate counting (r^2 : 0.92). Bouix and Ghorbal (2013) demonstrated a poor correlation between cFDA fluorescence and plate counts during the latency period and at the end of growth in FT80. These latter results appear to run counter those of Salma et al. (2012), maybe because Bouix and Ghorbal (2013) worked with FT80 medium which is different to the white wine medium used by Salma et al. (2012). Moreover, lower esterase fluorescence and an increase of cell autofluorescence through time in red wine can lead to difficulties in interpreting vitality. Moreover, regarding esterase activity, special attention must be given to FDA incubation: pH (7.6), temperature (30 °C) and time (20 min). Enzyme activity in these conditions is maximal (Adam and Duncan, 2001).

These markers are not specific, but they can be used during AF and MLF since, generally, only one species of yeasts or bacteria is present during these steps. However, in mixed culture conditions, these fluorescent dyes do not allow quantifying the vitality of each species.

2.1.2. Cell viability

Viability dyes determine if cells are in a physiological state sufficient to ensure their survival, and include measurements such as cell membrane permeability. Propidium Iodide (PI) is frequently used as a marker of membrane integrity (permeability) (Delobel et al., 2012). PI enters cells with permeable membranes (i.e. dead cells) and stains nucleic acids. PI staining results in the emission of red fluorescence (Fernandes et al., 2013; Landolfo et al., 2008; Mannazzu et al., 2008). Nevertheless, a significant disadvantage may occur when using PI: cell exposure to stressors like ethanol, which is known to permeabilize membranes (Alexandre et al., 1994), can result in staining live cells red (Davey and Hexley, 2011). This drawback may disturb the utilization of PI in wine due to ethanol formation during AF.

2.1.2.1. Yeasts. However, PI is currently used in wine for sediment monitoring (Gerbaux and Thomas, 2009) and for monitoring AF microorganisms in synthetic must (Branco et al., 2012; Delobel et al., 2012; Landolfo et al., 2008; Mannazzu et al., 2008). Chaney et al. (2006) and Farthing et al. (2007) reported a yeast viability control during AF using Thiazole Orange (TO), a permeant DNA-reactive dye that stains all cells (both dead and live) to discriminate cells from wine debris and PI, leading to a double-staining procedure for monitoring AF in red and white must. Branco et al. (2012) also used a double-staining procedure including 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), a fluorescent-blue dye that stains all cells (both dead and live), and PI staining in synthetic must, to assess the viability during fermentation of *S. cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* in single and mixed-cultures. In this study, they concluded that PI was an excellent stain for estimating the survival rate of yeast species during AF. Delobel et al. (2012) revealed an *S. cerevisiae* sub-population, called "fragile cells", after PI staining during AF in a synthetic must. This sub-population seemed to be formed by permeabilized cells stained by PI and thus damaged cells; however they were not dead because this state was reversible. Nevertheless, the authors demonstrated that this sub-population only occurs in a Ca^{2+}/Mg^{2+} starvation condition. Thus these chemical elements were important to maintain membrane impermeability and stability. Mg^{2+} could play a role in enzyme activation and cell membrane stabilization (Delobel et al., 2012).

2.1.2.2. Bacteria. Regarding wine bacteria, PI is sometimes used with other dyes such as SYTO 9 (LIVE/DEAD® kit, Invitrogen), which stain all bacteria green, in order to estimate more precisely the ratio of live/dead cells, as previously described, in growth medium (Bouix and Ghorbal, 2013). However, Mason et al. (1998)

Table 1
Several applications of dyes to enological microorganisms.

Functions	Dyes	Applications	Matrix	References
Vitality	FDA	AF microorganisms	Pinot Noir grape must; Red wine	Malacrino et al., 2001
		MLF microorganisms	Synthetic wine White and Red wines	Salma et al., 2013 Gerbaux and Thomas, 2009
	cFDA	AF microorganisms	Growth medium White wine Red wine	Bouix and Ghorbal, 2013 Salma et al., 2012 Malacrino et al., 2001
			Synthetic must	Bouix and Leveau, 2001
Viability (membrane integrity)	FUN-1	AF microorganisms	Synthetic wine	Bouchez et al., 2004
		Sediment monitoring	Wine	Salma et al., 2013
	PI	AF microorganisms	Synthetic must	Gerbaux and Thomas, 2009
				Landolfo et al., 2008
Vitality and Viability	CV6/PI	AF microorganisms	Red and White must White must	Mannazzu et al., 2008 Branco et al., 2012
		MLF microorganisms	Growth medium White and Red wines	Delobel et al., 2012 Chaney et al., 2006
	cFDA/PI	AF microorganisms	Cider must	Farthing et al., 2007
		MLF microorganisms	Growth medium	Bouix and Ghorbal, 2013
VBNC State (Flow cytometry versus Petri dish)	Specific probe	AF microorganisms	Cider	Salma et al., 2012
		Spoilage yeast	Synthetic must	Herrero et al., 2006
	CV6/PI	MLF microorganisms	Synthetic wine Cider	Serpaggi et al., 2012 Herrero et al., 2006
			Apple must and green cider	Quirós et al., 2009
Cell Cycle Analysis	SYBR Green	AF microorganisms	Synthetic must	Mendes-Ferreira et al., 2010
			Synthetic wine	Salma et al., 2013
Membrane potential	DiBAC ₄ (3)	AF microorganisms	Synthetic "beer wort"	Kobayashi et al., 2007
		MLF microorganisms	Growth medium White and Red wines	Bouix and Ghorbal, 2013 Salma et al., 2012
Reactive Oxygen Species (ROS) presence	MitoTracker® Red CMXRos	AF microorganisms	Synthetic must	Mendes-Ferreira et al., 2010
				Mendes-Ferreira et al., 2010
Intracellular Lipid Content	DHE	AF microorganisms	Synthetic "beer wort"	Kobayashi et al., 2007
				Mannazzu et al., 2008
Intracellular pH (pH _{in})	Nile Red	AF microorganisms	Synthetic must	Mannazzu et al., 2008
	cFDA-SE and CDCF	MLF microorganisms	Growth medium and white wine	Bouix and Ghorbal, 2015

Dyes: FDA: Fluorescein diacetate; cFDA: Carboxy fluorescein diacetate; FUN-1: 2-chloro-4-(2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene)-1-phenylquinolinium iodide; PI: Propidium iodide; CV6: Chemchrom V6; DiBAC₄(3): Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol; DHE: Dihydroethidium; DHR: Dehydrorhodamine; cFDA-SE: 5,6 carboxyfluorescein diacetate succinidyl ester; CDCF: 5–6 carboxy 2′7′-dichlorofluorescein.

Applications: AF: Alcoholic fermentation; MLF: Malolactic fermentation; VBNC: Viable but non culturable.

demonstrated that ethanol fixation modified outer membrane integrity in gram-negative organisms, causing a change of staining by PI (Gant et al., 1993; Roth et al., 1997). Salma et al. (2012) showed the difficulty of separating debris from bacteria using FCM, especially in red wine. The dyes tested in previous reports did not allow efficient staining of bacteria. Using FCM and a combination of DiBAC₄(3), widely called bis-oxonol or BOX, which measures membrane potential and serves as a counterstain, combined with PI dye, they were able to count *O. oeni* in wine during MLF. The analysis showed a strong correlation between the numbers of BOX/PI⁻ stained cells determined by FCM and the cell numbers determined by plate counts (red wine: r²: 0.97, white wine r²: 0.97) (Salma et al., 2012). The main objective was to determine the viability and leavening power of *O. oeni* during adaptation steps and before inoculation. Unfortunately, in cases of contamination, such as those encountered in the case of stuck fermentation, these methods cannot be used to distinguish *O. oeni* from the other types of spoilage bacteria. However, this is not a serious issue during fermentation because spoilage bacteria normally cause wine spoilage only during aging in the cellar and after bottling (Salma et al., 2012). Bouix and Ghorbal (2013) showed that double staining by SYTO 9/PI demonstrated that they were effective dyes for *O. oeni* enumeration. However, these results were validated in growth medium and not in an enological context. As vitality markers, these fluorescent dyes are not specific, and quantifying

the viability of one population in a mix of several species is not possible.

2.1.3. Viability and vitality double staining

Da Silveira et al. (2002) studied carboxyfluorescein (cF) retention and PI exclusion in *O. oeni* adapted to ethanol or not in FT80 medium. Fluorescence was measured after 16% (v/v) ethanol stress and without stress. The results showed no significant differences for either fluorescent dye without stress. However, ethanol stress led to a decrease of cF fluorescence of about 25% and an increase of PI fluorescence of about 80%. When cells were ethanol-adapted, they exhibited cF fluorescence of about 80% and PI fluorescence of about 60%. First, these results showed that ethanol adaptation was important for *O. oeni* vitality and viability during ethanol stress. Second, they demonstrated that PI fluorescence depends on the presence of ethanol. Thus PI was probably not adapted to quantifying bacterial viability in wine. In the study by Da Silveira et al. (2002), the authors used carboxyfluorescein (cF) retention as a viability marker, showing an increase of fluorescence from 15 min to 60 min, contrary to Malacrino et al. (2001), who observed a decrease of FDA fluorescence over time. Bouix and Ghorbal (2013) also used cFDA coupled with PI to monitor *O. oeni* during cell growth. However, they concluded that cFDA staining was not recommended to monitor bacterial growth because erroneous counts were highlighted during the latency period and at the end of

Table 2
Compositions of synthetic media used.

Synthetic medium	References	Compositions
Growth medium	Bouix and Ghorbal, 2013	Casamino acids (5 g L ⁻¹); Yeast extract (4 g L ⁻¹); Glucose (5 g L ⁻¹); Fructose (3.5 g L ⁻¹); DL-Malic acid (10 g L ⁻¹); KH ₂ PO ₄ (0.6 g L ⁻¹); KCl (0.45 g L ⁻¹); CaCl ₂ (0.13 g L ⁻¹); MgSO ₄ (0.13 g L ⁻¹); MnSO ₄ (0.003 g L ⁻¹); Tween 80 (1 mL); pH 4.5
	Monthéard et al., 2012	Xylose (20 g L ⁻¹); KH ₂ PO ₄ (4.5 g L ⁻¹); (NH ₄) ₂ SO ₄ (3 g L ⁻¹); Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O (1.5 g L ⁻¹); Sodium glutamate (1 g L ⁻¹); MgSO ₄ ·7 H ₂ O (1 g L ⁻¹); ZnSO ₄ ·7 H ₂ O (40 mg L ⁻¹); MnSO ₄ ·H ₂ O (3.8 mg L ⁻¹); CoCl ₂ ·6 H ₂ O (21 mg L ⁻¹); CuSO ₄ ·5 H ₂ O (2 mg L ⁻¹); Na ₂ MoSO ₄ ·2 H ₂ O (4.1 mg L ⁻¹); CaCl ₂ ·2 H ₂ O (23 mg L ⁻¹); (NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₆ ·6 H ₂ O (23 mg L ⁻¹); H ₃ BO ₃ (3 mg L ⁻¹); Panthotenate (3.7 mg L ⁻¹); Thiamine (1 mg L ⁻¹); Nicotinic acid (1.5 mg L ⁻¹); Pyridoxine (0.5 mg L ⁻¹); Meso-inositol (553.9 mg L ⁻¹); Para-aminobenzoic acid (0.2 mg L ⁻¹); Biotin (0.01 mg L ⁻¹)
Synthetic must	Andorra et al., 2011	Glucose (110 g L ⁻¹); Fructose (110 g L ⁻¹); Tartaric acid (6.0 g L ⁻¹); L-(2)-Malic acid (3.0 g L ⁻¹); Citric acid (0.5 g L ⁻¹); Yeast Nitrogen Base (YNB) (1.7 g L ⁻¹); Casamino acids (CAA) (2.0 g L ⁻¹); CaCl ₂ (0.2 g L ⁻¹); Arginine-HCl (0.8 g L ⁻¹); L-(2)-Proline (1.0 g L ⁻¹); L-(2)-Tryptophane (0.1 g L ⁻¹); pH 3.5
	Bouchez et al., 2004	Dextrose (150 g L ⁻¹); Yeast extract (2.5 g L ⁻¹); (NH ₄) ₂ SO ₄ (2.5 g L ⁻¹); K ₂ HPO ₄ (2.5 g L ⁻¹); MgSO ₄ (0.5 g L ⁻¹); pH 4 or 3.2
	Bouix and Leveau, 2001	Dextrose (150 g L ⁻¹); Yeast extract (2.5 g L ⁻¹); (NH ₄) ₂ SO ₄ (2.5 g L ⁻¹); K ₂ HPO ₄ (2.5 g L ⁻¹); MgSO ₄ (0.5 g L ⁻¹); pH 4 or 3.2
	Branco et al., 2012	Glucose (110 g L ⁻¹); Fructose (110 g L ⁻¹); L-(1)-Tartaric acid (6 g L ⁻¹); L-(2)-Malic acid (3 g L ⁻¹); Citric acid (0.5 g L ⁻¹); YNB (1.7 g L ⁻¹); Casamino acids (2 g L ⁻¹); CaCl ₂ (0.2 g L ⁻¹); Arginine-HCl (0.8 g L ⁻¹); L-(2)-Proline (1 g L ⁻¹); L-(2)-Tryptophane (0.1 g L ⁻¹); pH 3.5
	Delobel et al., 2012	Glucose (115 g L ⁻¹); Fructose (115 g L ⁻¹); Assimilable nitrogen (142 mg of N L ⁻¹); Ergosterol (0.75 mg L ⁻¹); Oleic acid (0.25 µL L ⁻¹); pH 3.3
	Landolfo et al., 2008	Glucose (120 g L ⁻¹); Fructose (120 g L ⁻¹); (NH ₄) ₂ SO ₄ (7 g L ⁻¹); Yeast Nitrogen Base (YNB) without amino acids (2 g L ⁻¹); pH 4.3
	Mannazzu et al., 2008	Glucose (120 g L ⁻¹); Fructose (120 g L ⁻¹); (NH ₄) ₂ SO ₄ (7 g L ⁻¹); Yeast Nitrogen Base (YNB) without amino acids (2 g L ⁻¹); Leucin (30 mg L ⁻¹); Histidine (20 mg L ⁻¹); Uracil (20 mg L ⁻¹); pH 4.4
Synthetic "beer wort"	Mendes-Ferreira et al., 2010	Formulated by Henschke and Jiranek (1993) with Glucose (200 g L ⁻¹); Diamonium phosphate (267 or 67 mg of N L ⁻¹)
	Kobayashi et al., 2007	Maltose (100 g L ⁻¹); Glucose (40 g L ⁻¹); Yeast extract (6 g L ⁻¹)
Synthetic wine	Salma et al., 2013	Glucose (1.5 g L ⁻¹); Fructose (1.5 g L ⁻¹); Yeast extract (1 g L ⁻¹); MgSO ₄ (0.025 g L ⁻¹); K ₂ SO ₄ (0.1 g L ⁻¹); Acetic acid (0.01%); DL-Malic acid (3 g L ⁻¹); Ethanol (8%); pH 3.5
	Serpaggi et al., 2012	Glucose (1.5 g L ⁻¹); Fructose (1.5 g L ⁻¹); Yeast extract (1 g L ⁻¹); MgSO ₄ (0.025 g L ⁻¹); K ₂ SO ₄ (0.1 g L ⁻¹); DL-Malic acid (3 g L ⁻¹); Acetic acid (0.01%); Ethanol (10% v/v); pH 3.5

growth. Regarding yeast enumeration, Herrero et al. (2006) studied cider AF yeasts (*S. cerevisiae* var. *bayanus*) using CV6, PI and DRAQ5 to quantify vitality, viability and total population, respectively. They demonstrated a high percentage of cells with considerable esterase activity and low cell permeability during cider AF. Monthéard et al. (2012) performed a double-staining procedure with PI and cFDA on *Candida shehatae* in growth medium. Few cells exhibited double fluorescence, revealing cells with damaged membranes but still metabolically active. Herrero et al. (2006) also used flow cytometry to monitor *O. oeni* states during a cider malolactic fermentation process. They excluded SYTOX orange and TOTO-1 dyes from their study as the results of these dyes were inconsistent. They preferred to use DRAQ5 to enumerate total population and ChemChrom CV6 and PI to detect viable bacteria, compared to colony formant unit (CFU) in plate counting.

Regarding MLF, they demonstrated an increase of bacteria labelled with PI. Moreover, the number of CV6 and PI stained bacteria was higher compared to total enumeration, suggesting a double stained bacteria, described previously by Amor et al. (2002). This problem may be due to the amount of ethanol produced by yeasts during AF, leading to the permeabilization of bacteria to PI, as in the case of yeasts presented by Davey and Hexley (2011).

Regarding vitality and viability fluorescent dyes, the choice is complex and depends on the microorganisms tested and the growth medium. Each dye has advantages and disadvantages, so progress must be made in developing new vitality and viability markers to obtain sensitive and reliable results under all wine conditions.

2.1.4. Viable But Non Culturable (VBNC) state

In most scientific publications, flow cytometry techniques are not used alone to assess cell viability. Indeed, culture-dependent or

independent methods like plate counts, microscopy and optical density are used to complement flow cytometry analysis. Also, when cell viability is assessed by flow cytometry, researchers often confirm whether the cells are cultivable on agar plates.

2.1.4.1. *Yeasts*. Andorra et al. (2011) mentioned that no difference between FCM and plate count data was established during AF with *S. cerevisiae* and *H. guilliermondii* in pure cultures. However, in mixed culture, *H. guilliermondii* yeasts exhibited a positive FCM signal, highlighting active cell metabolism, but no colony on agar plates could be counted after 100 h and 140 h according to the fermentation process, suggesting a yeast VBNC state in shaken and static cultures respectively. The effect of SO₂ was also studied by FCM as it is known to cause the entry of yeasts to a VBNC state (Divol and Lonvaud-Funel, 2005). Serpaggi et al. (2012) reported the VBNC state of the spoilage yeast *B. bruxellensis* in synthetic wine by comparing cultivable yeasts on agar plates and viability assessment with FDA staining. Salma et al. (2013) also studied the effect of SO₂ on the entry of *S. cerevisiae* cells into the VBNC state with resuscitation without cell growth.

2.1.4.2. *Bacteria*. Moreover, a study by Herrero et al. (2006) focused on malolactic bacteria and showed a mean percentage of about 70% of bacteria in VBNC state during the cider MLF process. They also showed the variability of VBNC state during the process, probably due to low pH, the presence of ethanol and nutrient deficiency. Quirós et al. (2009) studied VBNC state in apple must and green cider and proved that the VBNC state of malolactic bacteria induced by SO₂ increases fermentation process time, likely due to a reduction in substrate transport and metabolic activity levels, in order to minimize cellular energetic requirements (Oliver, 2005).

2.1.5. Cell cycle analysis

Cell cycle analysis provides knowledge on the state of cells and thus cell vitality. Mendes-Ferreira et al. (2010) and Salma et al. (2013) studied this parameter in *S. cerevisiae*. The first authors studied the influence of nitrogen during AF in synthetic must using SYBR Green as the cell cycle phase dye. The cell cycle was stopped in phases G0/G1 when nitrogen was exhausted from the medium. Salma et al. (2013) studied the cell cycle during VBNC state using PI dye in synthetic wine. Cells exited from VBNC state without DNA replication, so without growth when environmental stress was removed, validating the VBNC state of *S. cerevisiae*. Recently, Steensels et al. (2014) and Walther et al. (2014) used FCM to measure the DNA content of several *S. cerevisiae* strains with a PI staining procedure in growth medium. Cells were separated according to their fluorescence intensity which reflects the DNA content due to PI binding to DNA after cell permeabilization with 70% ethanol. The same protocol was used by Jayakody et al. (2014) in growth medium. They studied the impact of adding fermentation inhibitors to cell cycles and concluded that inhibitors such as glycolaldehyde, furfural, 5-hydroxymethylfurfural, methylglyoxal and acetic acid caused G2/M arrest in control yeast cells. Thus cell cycle analysis provides knowledge on cell growth and therefore on cell viability and vitality.

2.1.6. Membrane potential

DiBAC₄(3), widely called oxonol, which measures membrane potential, has been proposed as a potential vitality dye (Lloyd and Hayes, 1995).

2.1.6.1. Yeasts. Sterols in yeast are synthesized by enzymes located in the endoplasmic reticulum membrane and are enriched in the plasma membrane where the final form of the yeast sterol, mainly ergosterol, is able to maintain the permeability barrier of the membrane (Dupont et al., 2011; Haines, 2001). Kobayashi et al. (2007) used oxonol for fermentation monitoring by *Saccharomyces carlsbergensis* in synthetic medium. In this study, the total population of yeasts were separated into two groups: one with high fluorescence intensity (cells with a depolarized membrane, i.e. dying cells) and the other with low fluorescence intensity (cells with polarized membranes, i.e. live cells).

2.1.6.2. Bacteria. Regarding bacteria, Salema et al. (1996) demonstrated that MLF performed by *O. oeni* generated an electrical potential gradient which controls the fermentation rate. Malate influx led to an increase of the negative charges in the cell, subsequently improving membrane polarization (Loubiere et al., 1992; Salema et al., 1994, 1996). The latter decreased at the end of MLF when malate was exhausted in the medium and thus when malate influx was lower. Bouix and Ghorbal (2013) used a DiBAC₄(3) probe to demonstrate that increased cell polarization leads to a decrease in MLF lag time in growth medium. Thus redox membrane potential is an important parameter in wine production. Salma et al. (2012) also used this dye as a marker of metabolic stress since the electron system across the cell membrane was disrupted.

2.1.7. Intracellular reactive oxygen species (ROS)

Intracellular reactive oxygen species accumulation can be monitored by MitoTracker[®] Red H₂-CMX Ros dye (Molecular Probes[™]) which is sensitive to overall cellular ROS, and by dihydroethidium (DHE), which is sensitive to superoxide anions but considered as a minor contributor to overall ROS (Mendes-Ferreira et al., 2010). Nutritional and environmental stresses, such as nitrogen depletion, led to ROS accumulation in cells and affected synthetic must fermentation (Mendes-Ferreira et al., 2010). These authors showed a close relationship between the increase of

reactive oxygen species accumulation and the negative effects on cell membrane integrity. Therefore, MitoTracker[®] Red H₂-CMX Ros and DHE dyes may be predictive markers of fermentation problems. Another dye, dehydrorhodamine (DHR), which was converted to the fluorescent compound Rhodamine 123 (Rh123) through interaction with ROS (Henderson and Chappell, 1993), was also used in the fermentation monitoring of *S. carlsbergensis* in synthetic beer must medium (Kobayashi et al., 2007).

2.1.8. Intracellular lipid content

Inspired by the work of Greenspan et al. (1985), Mannazzu et al. (2008) developed a method to determine the intracellular neutral lipid concentration in FCM by Nile Red during fermentation in synthetic must medium performed by *S. cerevisiae*. The formation of lipid granules may be considered as a survival mechanism involved in the detoxification of excess sterols, sterol precursors and/or fatty acids, which could cause membrane perturbations (Müllner and Daum, 2004). Oxygen starvation during AF inhibits the synthesis of certain sterols and lipids, thus FCM can be used to determine oxygen deficiency.

2.1.9. Intracellular pH

Intracellular pH (pH_{in}) is an important parameter due to its implication in physiological and metabolic functions like NAD⁺/NADH equilibrium and ATPase and enzymatic activities (Bouix and Ghorbal, 2015; Orij et al., 2009). Thus, a perturbation in pH_{in} could lead to a disruption in cell growth and thus to stuck fermentations. To measure cell pH_{in}, Bouix and Ghorbal (2015) established a calibration curve with two probes to cover a wide range of pH. 5,6 carboxy 2',7' dichlorofluorescein diacetate (CDCF) was used for pH values ranging from 3 to 4.5 and 5,6 carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (cFDA-SE) was used for pH values ranging from 4 to 7. These authors highlighted that *O. oeni* with a pH_{in} of 5.9 or 3.2 led to a lag time of 4 h–120 h in synthetic medium, respectively, and 24 h–504 h in white wine, respectively. Higher vitality, pH_{in} and polarization of inoculated cells, led to shorter MLF lag time. Thus, flow cytometry is a fast method for measuring the pH_{in} of *O. oeni* which governs MLF efficiency.

2.2. Specific enumeration of wine microorganisms

2.2.1. Using specific antibodies

The use of flow cytometry is not limited to staining procedures with fluorescent dyes like those described above. Rodriguez and Thornton (2008) developed a method to distinguish and quantify *S. cerevisiae* from other yeasts such as the genus *Hanseniaspora* in natural must fermentation. First, they incubated grape must with an anti-*Saccharomyces* polyclonal antibody and then a second incubation was performed with a secondary antibody coupled with Alexa Fluor[®] 488 before FCM analysis. Rodriguez and Thornton (2008) developed a green fluorescent polyclonal antibody for *O. oeni* discrimination used with PI to monitor MLF performed simultaneously with AF in Chardonnay must. The authors considered bacteria with green fluorescence and without red fluorescence as viable *O. oeni* whereas Green⁺/Red⁺ fluorescence reflected dead bacteria. However, no plate counts/FCM comparison was performed. They concluded that viable and nonviable yeast and bacterial populations can be rapidly discriminated in simultaneous malolactic-alcoholic wine fermentations using antibodies, fluorescent dyes and FCM.

This method may be used to detect and quantify yeasts leading to wine spoilage. Indeed, the well-known spoilage yeast *B. bruxellensis* is one of the worst nightmares for winemakers. This yeast may be present in red wine and is able to produce several volatile compounds, like volatile phenols, responsible for off-

flavors commonly called “Brett character” (Romano et al., 2008). *B. bruxellensis* can easily proliferate, despite the worst conditions in wine (Conterno et al., 2006). Thus *B. bruxellensis* detection and enumeration must be rapid and specific. Recently, an immunocytometry test has been developed (Chaillat et al., 2014) which consists in using an anti-*Brettanomyces* polyclonal antibody conjugated with a fluorochrome to specifically distinguish and quantify *Brettanomyces* among other yeast species with significant efficiency in synthetic medium. They confirmed their enumeration in wine and cider, thus *Brettanomyces* can be detected and quantified in less than two hours with this method.

2.2.2. Using fluorescent *in situ* Hybridization (FISH)

The fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) technique may be coupled with FCM to specifically quantify wine microorganisms. FISH was used for several years (Wallner et al., 1993) but was mostly visualized by epifluorescence microscopy before being combined with FCM in the last decade (Inácio et al., 2003).

A fluorescent-labelled oligonucleotide probe designed to bind to a certain sequence of the 26S rRNA D1-D2 region allowed yeast specific staining since the D1-D2 region showed a high degree of species variation (Xufre et al., 2006). Thus, to hybridize a probe with the 26S rRNA sequence before FCM analysis, cells were permeabilized and then suspended in a hybridization buffer containing a small quantity of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), formamide, dextran sulfate or salmon sperm for example, before adding the fluorescent-labelled probe (Wallner et al., 1993). The first two chemical compounds improve the entry and the probe hybridization whereas the last two enhance the probe specificity. The FISH-FCM technique was validated by several authors such as Andorra et al. (2011) and Branco et al. (2012) who hybridized a specifically fluorescent-labelled probe in *S. cerevisiae* and *H. guilliermondii* to monitor fermentation in single and mixed culture directly in wine. Thus they were able to discriminate both species in mixed fermentation due to the species-specific properties of the FISH probes. Similarly, the study conducted by Wang et al. (2014b) presented three species-specific probes targeting the 26S rRNA D1-D2 region of *S. cerevisiae*, *H. uvarum* and *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*). They demonstrated a suitable distinction between those species during fermentation in mixed-culture and co-inoculated wine. The FISH-FCM technique can also be used to detect and/or quantify spoilage yeasts. In this case, Serpaggi et al. (2010) developed a FISH-FCM effective strategy to detect and quantify *B. bruxellensis* directly in red wine. They used the 26S-D.brux.5.1 probe designed by Röder et al. (2007) and obtained good correlation between FCM and plate counting in a selective medium.

2.2.3. Using fluorescent strains of microorganisms

Another method of monitoring a population in a mixed culture is to use a reporter gene, such as the *GFP* gene from *Aequorea victoria* coding for the green fluorescent protein (Gfp) (Niedenthal et al., 1996) which can be detected by FCM. *GFP* reporter construction in a yeast strain consists of a homologous recombination between a specific plasmid (with a specific cassette, like the kanMX cassette, allowing recombination) and the yeast genome, replacing a target gene by the *GFP* gene behind a promoter of interest. The amount of Gfp produced from this promoter can then be quantified in living yeast cells by FCM.

Consequently, the use of a strain with a *GFP* reporter in a mixed population during laboratory fermentation tended to generalize. Tesnière et al. (2013) used a *S. cerevisiae*-*GFP* strain in order to monitor yeast viability in synthetic must with different nitrogen contents. Kitagaki and Shimoi (2007) and Shiroma et al. (2014) described a method to monitor mitophagy during sake

fermentation with a *S. cerevisiae* which exhibited a mitochondrion-*GFP* (called mito-*GFP*) informing on yeast fitness. Recently, Marsit et al. (2015) have constructed a *S. cerevisiae*-*GFP* strain to estimate cell viability with a double staining procedure (*GFP*/*IP*) during synthetic must fermentation, and more interestingly to differentiate this *GFP*-strain from another *S. cerevisiae* strain, mutated with a gene expressing a red fluorescent protein (t-dimer2) in medium.

Thus the *GFP* reporter technique has been used for two decades with yeasts (Kahana et al., 1995; Niedenthal et al., 1996) and so is well-controlled, with a large choice of available plasmids for recombination, and can now be easily detected by FCM to monitor yeast fermentation.

3. Perspectives: other dyes used with wine yeasts and bacteria applicable to flow cytometry

Another way to estimate cell viability is to use microscopy techniques, especially the Direct Epifluorescence Filter Technique (DEFT) which is in direct relation with FCM because the same dyes can be applied with these two methods (Davey and Hexley, 2011; Delobel et al., 2012; Wang et al., 2014b). The main advantages exhibited by FCM are that it is more accurate, sensitive and, most importantly, less time-consuming. But many studies have used microscopy to determine fluorescence. Protocols have to be changed to adapt FCM analysis but the staining procedure is the same.

3.1. Fluorescent dyes

3.1.1. Membrane fluidity

Membrane fluidity is known to be an important indicator of potentially disturbing environmental influences. Thus monitoring membrane fluidity can give more detailed information on key aspects of cell responses to growth states. Tourdot-Maréchal et al. (2000) showed that membrane fluidity decreases when *O. oeni*, adapted to alcohol or not, is exposed to ethanol stress. Thus ethanol increases permeability but not fluidity. Müller et al. (2000) studied this parameter with the 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) dye using FCM. Thus yeasts and bacteria membrane fluidity in wine can be studied by flow cytometry.

3.1.2. Viable But Non Cultivable (VBNC) state

The results obtained by Millet and Lonvaud-Funel (2000) showed that the VBNC state of AAB was induced quickly by O_2 deprivation in red wine. Recovery from this cultivability was very rapid as soon as O_2 was available. For LAB, a similar state was induced by sulfite addition (Millet and Lonvaud-Funel, 2000). These results were based on the comparison of bacterial enumeration between plate counts and DEFT. The latter was performed using the Chemunex system in a red wine matrix. It is based on the hydrolysis of the substrate which generates fluorescence, so this dye is considered as a vitality dye and the method can be adapted to flow cytometry.

3.1.3. Using FISH for specific LAB and yeast identification and enumeration

Few studies have used oligonucleotide probes coupled to flow cytometry in wine. Stender et al. (2001) developed a FISH-based method by labelling a Peptid Nucleic Acid (PNA) probe coupled to fluorescein. The main difference between probes constituted of oligonucleotides or PNA is that the latter is not charged and penetrates more easily within cells.

3.1.3.1. Yeasts. This fluorescein-labelled PNA probe was able to target a species-specific sequence of the 26S rRNA D1-D2 regions of

B. bruxellensis isolates from wine samples. But the major drawback of this technique was its cost, which was very high in comparison to the classical FISH method. Nevertheless, the high specificity of the PNA-FISH technique means that it could be applied to other wine yeasts, and directly in wine for comparison with classic probes used in FISH techniques. *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *H. guilliermondii*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. thermotolerans*, *Pichia anomala*, *P. membranifaciens*, and *Torulaspora delbrueckii* isolated from wine samples were discriminated by the FISH method coupled to epifluorescence (Xufre et al., 2006). The latter also designed a probe specific for *C. stellata* but this yeast emitted a fluorescence signal with the other probes tested.

3.1.3.2. Bacteria. For wine bacteria, Blasco et al. (2003) referenced and developed specific probes for various species belonging to the LAB species present in must and wine: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Oenococcus*. Visualization was performed by fluorescence microscopy. This work referenced fourteen probes specifically for *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. collinoides*, *L. coryniformis*, *L. farciminis*, *L. hilgardii*, *L. mali*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. zeae*, *Leuconostoc* sp., *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *P. parvulus* and, *O. oeni*. Detection of these probes, and so of these bacteria, may be performed by FCM after adapting the hybridization protocol.

3.2. Other interesting "future" techniques

As demonstrated above, FCM techniques have been used successfully for several years with both bacteria and yeasts to monitor vitality, viability and other cell parameters during AF and MLF. FCM is also a good technique for measuring leavening viability, with fermentations performed before the inoculation of grape must (Díaz et al., 2010). However, other techniques are available in addition to classic FCM. Fluorescence Activated Cell-Sorting (FACS) has been known for several decades (Fulwyley, 1965) and is complementary to FCM. Firstly, this technique is similar to classical FCM, but after the passage of cells through the laser beam they are fractionated into droplets (containing only one cell) by ultrasonic vibrations, after which an electric charge is applied to each droplet according to their fluorescence intensity (threshold determined by the user) (Julius et al., 1972). Thus each droplet is separated according to its electric charge in an electrostatic field and collected individually. The FACS technique is often used in the clinical field for cardio-vascular diseases (Gibson et al., 2004), cancer stem cell identification (Wang et al., 2014a) and immune system studies (Shroff et al., 1995). Nevertheless, some publications have reported using FACS for bacteria, like *Escherichia coli* (Fuchs et al., 1996) and aquatic bacteria (Tada and Grossart, 2014). The cells are separated according to their fluorescence intensity for further analysis. In laboratory studies, FISH coupled with FACS could be used to separate a specific subpopulation within a whole microorganism population.

As described above, cell detection and enumeration by immunocytochemistry work well with both yeasts and bacteria (Rodríguez and Thornton, 2008), but the major drawbacks of using antibodies are their very high cost and their low stability. Thus new small oligonucleotides, called aptamers, were designed in the 1990s and were found to be able to bind with both high specificity and affinity to a ligand on the cell surface (Ellington and Szostak, 1990; Jayasena, 1999; Toulmé and Giegé, 1998). A specific process for synthesizing these aptamers was developed, called systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) (Meyer et al., 2013). Nowadays, aptamers are primarily used as fluorescent probes in clinical diagnosis. Indeed, aptamers are currently available for use against pathogenic bacteria, such as anti-*Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* aptamers. In

addition, aptamers and FACS can be coupled to select and separate aptamers of interest, using fluorescently labelled nucleic acids during the cell-SELEX process (Moon et al., 2014), portending a possible application in wine for the separation of microorganisms of interest. Thus aptamers could be a very interesting tool in wine for detecting and quantifying specific microorganisms during AF and MLF by FCM or FACS.

Acetic acid bacteria are considered to be spoilage bacteria in winemaking, and their growth results in the oxidation of ethanol to acetic acid (acetification process). Thus the detection and enumeration of AAB during wine production are important to better understand AAB population dynamics, as well as to maintain the quality of the final product. Torija et al. (2010) and Valera et al. (2013) developed AAB specific TaqMan probes to detect and quantify these bacteria using qPCR, but this technique is expensive and quite fastidious, as described above. Therefore, the FISH technique may be the key to this problem with the development of AAB specific fluorescent probes to differentiate these bacteria from LAB, like *O. oeni*. Probes may be coupled directly to fluorescent dye or to horseradish peroxidase (HRP) to amplify fluorescent signals, using tyramide coupled to fluorescent dye. The latter is accumulated in the cells after release (Yamaguchi et al., 2015). High fluorescence is required to discriminate bacteria from background noise.

Another interesting technique based on fluorescence is the use of Quantum Dots (QDs). QDs are semiconductor nanocrystals with an inorganic core. They are able to absorb light over a very broad spectral range (Dabbousi et al., 1995; Mattoussi et al., 2000; West and Halas, 2000) and have narrow photoluminescence spectra dependent on their diameters (Bagalkot et al., 2007; West and Halas, 2000). Moreover, they have good stability, a high photobleaching threshold and a QD mix can be excited by a single laser wavelength with different emission wavelengths, making them interesting for FCM analysis. They conjugate with molecules that bind to the target cells for direct use in biological and clinical studies. Nowadays, QDs are used in conjugation with aptamers (Duan et al., 2013) or antibodies (Han et al., 2015) and detected by FCM. Indeed, Wang et al. (2015) have constructed antibody-QDs conjugate probes able to bind to three food pathogenic bacteria, i.e. *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, with high sensitivity and specificity, allowing rapid and species-specific detection of these microorganisms by fluorescent microscopy in the same food sample, based on QD properties. A study by Duan et al. (2013) showed aptamer-QDs conjugate as probes capable of binding to pathogenic bacteria like *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella* Typhimurium, allowing species-specific detection by FCM. Therefore, aptamers and antibodies are very interesting tools, and when conjugated with QDs could be a highly specific and sensitive technique for precisely detecting and quantifying microorganisms in must fermentation or directly in finished wine by FCM analysis.

Nevertheless, with the constant evolution of technologies, promising new FCM techniques are emerging and include Mass Cytometry (also called Cy-TOF), Imaging Flow Cytometry and, more recently, Spectral Cytometry. All these promising Flow Cytometry based-techniques will offer better precision, specificity and multiple analyses of the same wine sample.

Acknowledgments

This work was supported by the Regional Council of Burgundy, the Interprofessional Office of Burgundy Wines (B185 CVHCP-2013) and the Ministry of Higher Education and Research. The authors would also like to thank Juliane Mouries for her graphical assistance.

References

- Adam, G., Duncan, H., 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol. Biochem.* 33, 943–951.
- Alexandre, H., Rousseaux, I., Charpentier, C., 1994. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol. Lett.* 124, 17–22.
- Amor, K.B., Breeuwer, P., Verbaarschot, P., Rombouts, F.M., Akkermans, A.D.L., Vos, W.M.D., Abee, T., 2002. Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead bifidobacterium cells during bile salt stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5209–5216.
- Andorra, I., Monteiro, M., Esteve-Zarzoso, B., Albergaria, H., Mas, A., 2011. Analysis and direct enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* populations during alcoholic fermentation by fluorescence *in situ* hybridization, flow cytometry and quantitative PCR. *Food Microbiol.* 28, 1483–1491.
- Bagalkot, V., Zhang, L., Levy-Nissenbaum, E., Jon, S., Kantoff, P.W., Langer, R., Farokhzad, O.C., 2007. Quantum dot–aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer. *Nano Lett.* 7, 3065–3070.
- Blasco, L., Ferrer, S., Pardo, I., 2003. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 225, 115–123.
- Bouchez, J.C., Cornu, M., Danzart, M., Leveau, J.Y., Duchiron, F., Bouix, M., 2004. Physiological significance of the cytometric distribution of fluorescent yeasts after viability staining. *Biotechnol. Bioeng.* 86, 520–530.
- Bouix, M., Ghorbal, S., 2015. Rapid assessment of *Oenococcus oeni* activity by measuring intracellular pH and membrane potential by flow cytometry, and its application to the more effective control of malolactic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 193, 139–146.
- Bouix, M., Ghorbal, S., 2013. Rapid enumeration of *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation by flow cytometry. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1075–1081.
- Bouix, M., Leveau, J.-Y., 2001. Rapid assessment of yeast viability and yeast vitality during alcoholic fermentation. *J. Inst. Brew.* 107, 217–225.
- Branco, P., Monteiro, M., Moura, P., Albergaria, H., 2012. Survival rate of wine-related yeasts during alcoholic fermentation assessed by direct live/dead staining combined with fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Food Microbiol.* 158, 49–57.
- Bruetschy, A., Laurent, M., Jacquet, R., 1994. Use of flow cytometry in oenology to analyse yeasts. *Lett. Appl. Microbiol.* 18, 343–345.
- Chaillat, L., Martin, G., Genty, V., 2014. Mise au point d'une méthode de détection des *Brettanomyces* par immunocytométrie. Personal communication in SFI-AFC Congress.
- Chaney, D., Rodriguez, S., Fugelsang, K., Thornton, R., 2006. Managing high-density commercial scale wine fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 100, 689–698.
- Conterno, L., Joseph, C.M.L., Arvik, T.J., Henick-Kling, T., Bisson, L.F., 2006. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 139–147.
- Dabbousi, B.O., Bawendi, M.G., Onitsuka, O., Rubner, M.F., 1995. Electroluminescence from CdSe quantum-dot/polymer composites. *Appl. Phys. Lett.* 66, 1316–1318.
- Da Silveira, M.G., Romão, M.V.S., Loureiro-Dias, M.C., Rombouts, F.M., Abee, T., 2002. Flow cytometric assessment of membrane integrity of ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6087–6093.
- Davey, H.M., Hexley, P., 2011. Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. *Environ. Microbiol.* 13, 163–171.
- Delobel, P., Pradal, M., Blondin, B., Tesniere, C., 2012. A “fragile cell” sub-population revealed during cytometric assessment of *Saccharomyces cerevisiae* viability in lipid-limited alcoholic fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 338–344.
- Diaper, J.P., Edwards, C., 1994. The use of fluorogenic esters to detect viable bacteria by flow cytometry. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 221–228.
- Díaz, M., Herrero, M., García, L.A., Quirós, C., 2010. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochem. Eng. J.* 48, 385–407. Invited Review Issue 2010.
- Divol, B., Lonvaud-Funel, A., 2005. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *J. Appl. Microbiol.* 99, 85–93.
- Duan, N., Wu, S., Yu, Y., Ma, X., Xia, Y., Chen, X., Huang, Y., Wang, Z., 2013. A dual-color flow cytometry protocol for the simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella typhimurium* using aptamer conjugated quantum dots as labels. *Anal. Chim. Acta* 804, 151–158.
- Dupont, S., Beney, L., Ferreira, T., Gervais, P., 2011. Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochim. Biophys. Acta BBA Biomembr.* 1808, 1520–1528.
- Ellington, A.D., Szostak, J.W., 1990. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818–822.
- Farthing, J.B., Rodriguez, S.B., Thornton, R.J., 2007. Flow cytometric analysis of *Saccharomyces cerevisiae* populations in high-sugar Chardonnay fermentations. *J. Sci. Food Agric.* 87, 527–533.
- Fernandes, R.L., Carlquist, M., Lundin, L., Heins, A.L., Dutta, A., Sørensen, S.J., Jensen, A.D., Nopens, I., Lantz, A.E., Gernaey, K.V., 2013. Cell mass and cell cycle dynamics of an asynchronous budding yeast population: experimental observations, flow cytometry data analysis, and multi-scale modeling. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 812–826.
- Fuchs, P., Weichel, W., Dübel, S., Breitling, F., Little, M., 1996. Separation of *E. coli* expressing functional cell-wall bound antibody fragments by FACS. *Immunotechnology* 2, 97–102.
- Fulwyler, M.J., 1965. Electronic separation of biological cells by volume. *Science* 150, 910–911.
- Gant, V.A., Warnes, G., Phillips, I., Savidge, G.F., 1993. The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics. *J. Med. Microbiol.* 39, 147–154.
- Gerbaux, V., Thomas, J., 2009. Utilisations pratiques de la cytométrie de flux pour le suivi des levures en œnologie. *Rev. Fr. Oenologie* 8–13.
- Gibson, F.C., Hong, C., Chou, H.H., Yumoto, H., Chen, J., Lien, E., Wong, J., Genco, C.A., 2004. Innate immune recognition of invasive bacteria accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 109, 2801–2806.
- Greenspan, P., Mayer, E.P., Fowler, S.D., 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.* 100, 965–973.
- Guillamón, J.M., Mas, A., 2011. Chapter 9–Acetic acid bacteria. In: Carrascosa, A.V., Muñoz, R., González, R. (Eds.), *Molecular Wine Microbiology*. Academic Press, San Diego, pp. 227–255.
- Haines, T.H., 2001. Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Prog. Lipid Res.* 40, 299–324.
- Han, H.S., Niemeyer, E., Huang, Y., Kamoun, W.S., Martin, J.D., Bhaumik, J., Chen, Y., Roberge, S., Cui, J., Martin, M.R., Fukumura, D., Jain, R.K., Bawendi, M.G., Duda, D.G., 2015. Quantum dot/antibody conjugates for *in vivo* cytometric imaging in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 1350–1355.
- Henderson, L.M., Chappell, J.B., 1993. Dihydrohodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur. J. Biochem.* 217, 973–980.
- Henry-Stanley, M.J., Garni, R.M., Wells, C.L., 2004. Adaptation of FUN-1 and Calcofluor white stains to assess the ability of viable and nonviable yeast to adhere to and be internalized by cultured mammalian cells. *J. Microbiol. Methods* 59, 289–292.
- Henschke, P.A., Jiranek, V., 1993. Yeast: metabolism of nitrogen compounds. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic, Chur, Switzerland, pp. 77–165.
- Herrero, M., Quirós, C., García, L.A., Díaz, M., 2006. Use of flow cytometry to follow the physiological states of microorganisms in cider fermentation processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6725–6733.
- Inácio, J., Behrens, S., Fuchs, B.M., Fonseca, Á., Spencer-Martins, I., Amann, R., 2003. *In situ* accessibility of *Saccharomyces cerevisiae* 26S rRNA to Cy3-labeled oligonucleotide probes comprising the D1 and D2 domains. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2899–2905.
- Jayakody, L.N., Kadowaki, M., Tsuge, K., Horie, K., Suzuki, A., Hayashi, N., Kitagaki, H., 2014. SUMO expression shortens the lag phase of *Saccharomyces cerevisiae* yeast growth caused by complex interactive effects of major mixed fermentation inhibitors found in hot-compressed water-treated lignocellulosic hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 501–515.
- Jayasena, S.D., 1999. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.* 45, 1628–1650.
- Julius, M.H., Masuda, T., Herzenberg, L.A., 1972. Demonstration that antigen-binding cells are precursors of antibody-producing cells after purification with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 1934–1938.
- Kahana, J.A., Schnapp, B.J., Silver, P.A., 1995. Kinetics of spindle pole body separation in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9707–9711.
- Kitagaki, H., Shimoi, H., 2007. Mitochondrial dynamics of yeast during sake brewing. *J. Biosci. Bioeng.* 104, 227–230.
- Kobayashi, M., Shimizu, H., Shioya, S., 2007. Physiological analysis of yeast cells by flow cytometry during serial-repitching of low-malt beer fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 451–456.
- Landolfo, S., Politi, H., Angelozzi, D., Mannazzu, I., 2008. ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. *Biochim. Biophys. Acta BBA Gen. Subj.* 1780, 892–898.
- Lloyd, D., Hayes, A.J., 1995. Vigour, vitality and viability of microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 133, 1–7.
- Longobardi-Givan, A., 2001. *Flow Cytometry: First Principles*, second ed. John Wiley & Sons, New York.
- Loubiere, P., Salou, P., Leroy, M.J., Lindley, N.D., Pareilleux, A., 1992. Electrogonic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose-malate mixtures. *J. Bacteriol.* 174, 5302–5308.
- Malacrino, P., Zapparoli, G., Torriani, S., Dellaglio, F., 2001. Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *J. Microbiol. Methods* 45, 127–134.
- Mannazzu, I., Angelozzi, D., Belviso, S., Budroni, M., Farris, G.A., Goffrini, P., Lodi, T., Marzona, M., Bardi, L., 2008. Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 84–91.
- Marsit, S., Mena, A., Bigey, F., Sauvage, F.-X., Couloux, A., Guy, J., Legras, J.-L., Barrio, E., Dequin, S., Galeote, V., 2015. Evolutionary advantage conferred by an Eukaryote-to-Eukaryote gene transfer event in wine yeasts. *Mol. Biol. Evol.* 32, 1695–1707.
- Mason, D.J., Shanmuganathan, S., Mortimer, F.C., Gant, V.A., 1998. A fluorescent gram stain for flow cytometry and epifluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2681–2685.
- Mattoussi, H., Mauro, J.M., Goldman, E.R., Anderson, G.P., Sundar, V.C., Mikulec, F.V.,

- Bawendi, M.G., 2000. Self-assembly of CdSe–ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 12142–12150.
- Mendes-Ferreira, A., Sampaio-Marques, B., Barbosa, C., Rodrigues, F., Costa, V., Mendes-Faia, A., Ludovico, P., Leão, C., 2010. Accumulation of non-superoxide anion reactive oxygen species mediates nitrogen-limited alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7918–7924.
- Meyer, M., Scheper, T., Walter, J.-G., 2013. Aptamers: versatile probes for flow cytometry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7097–7109.
- Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 136–141.
- Monthéard, J., Garcier, S., Lombard, E., Cameleyre, X., Guillouet, S., Molina-Jouve, C., Alfenore, S., 2012. Assessment of *Candida shehatae* viability by flow cytometry and fluorescent probes. *J. Microbiol. Methods* 91, 8–13.
- Moon, J.-H., Kim, G., Park, S.B., Lim, J., Mo, C., 2014. The importance of FACS analysis in the development of aptamers specific to pathogens. *J. Biosyst. Eng.* 39, 111–114.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Suberviola, J., Bartolomé, B., Colomo, B., Suárez, J.A., 2003. Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4084–4088.
- Müller, S., Ullrich, S., Lösche, A., Loffhagen, N., Babel, W., 2000. Flow cytometric techniques to characterise physiological states of *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Microbiol. Methods* 40, 67–77.
- Müllner, H., Daum, G., 2004. Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochim. Pol.* 51, 323–347.
- Muñoz, R., Moreno-Arribas, M.V., Rivas, B. de las, 2011. Chapter 8-Lactic acid bacteria. In: Carrascosa, A.V., Muñoz, R., González, R. (Eds.), *Molecular Wine Microbiology*. Academic Press, San Diego, pp. 191–226.
- Niedenthal, R.K., Riles, L., Johnston, M., Hegemann, J.H., 1996. Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast* 12, 773–786.
- Oliver, J.D., 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43, 93–100.
- O'Neill, K., Aghaepour, N., Špidlen, J., Brinkman, R., 2013. Flow cytometry bioinformatics. *PLoS Comput. Biol.* 9, e1003365.
- Orij, R., Postmus, J., Ter Beek, A., Brul, S., Smits, G.J., 2009. *In vivo* measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology* 155, 268–278.
- Prosperi, E., Croce, A.C., Bottiroli, G., Supino, R., 1986. Flow cytometric analysis of membrane permeability properties influencing intracellular accumulation and efflux of fluorescein. *Cytometry* 7, 70–75.
- Quiros, C., Herrero, M., García, L.A., Díaz, M., 2009. Quantitative approach to determining the contribution of viable-but-nonculturable subpopulations to malolactic fermentation processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2977–2981.
- Razmkhab, S., Lopez-Toledano, A., Ortega, J.M., Mayen, M., Merida, J., Medina, M., 2002. Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7432–7437.
- Röder, C., König, H., Fröhlich, J., 2007. Species-specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA. *FEMS Yeast Res.* 7, 1013–1026.
- Rodríguez, S.B., Thornton, R.J., 2008. Use of flow cytometry with fluorescent antibodies in real-time monitoring of simultaneously inoculated alcoholic-malolactic fermentation of Chardonnay. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 38–42.
- Romano, A., Perello, M.C., de Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2008. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1577–1585.
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., Rasmussen, O.F., 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17, 37–45.
- Roth, B.L., Poot, M., Yue, S.T., Millard, P.J., 1997. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2421–2431.
- Salema, M., Capucho, I., Poolman, B., Romão, M.V.S., Dias, M.C., 1996. *In vitro* reassembly of the malolactic fermentation pathway of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*). *J. Bacteriol.* 178, 5537–5539.
- Salema, M., Poolman, B., Lolkema, J.S., Dias, M.C.L., Konings, W.N., 1994. Uniport of monoanionic L-malate in membrane vesicles from *Leuconostoc Oenos*. *Eur. J. Biochem.* 225, 289–295.
- Salma, M., Rousseaux, S., Sequeira-Le Grand, A., Alexandre, H., 2012. Cytometric detection of wine lactic acid bacteria: application of malolactic fermentation to the monitoring. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 63–73.
- Salma, M., Rousseaux, S., Sequeira-Le Grand, A., Divol, B., Alexandre, H., 2013. Characterization of the viable but nonculturable (VBNC) state in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 8, e77600.
- Serpaggi, V., Remize, F., Sequeira-Le Grand, A., Alexandre, H., 2010. Specific identification and enumeration of the spoilage microorganism *Brettanomyces* in wine by flow cytometry: a useful tool for winemakers. *Cytom. A* 77A, 497–499.
- Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., Alexandre, H., 2012. Characterization of the "viable but nonculturable" (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiol.* 30, 438–447.
- Shapiro, H.M., 2003. *Practical Flow Cytometry*, fourth ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Shiroma, S., Jayakody, L.N., Horie, K., Okamoto, K., Kitagaki, H., 2014. Enhancement of ethanol fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast by disrupting mitochondria function. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1002–1012.
- Shroff, K.E., Meslin, K., Cebra, J.J., 1995. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect. Immun.* 63, 3904–3913.
- Steensels, J., Meersman, E., Snoek, T., Saelens, V., Verstrepen, K.J., 2014. Large-scale selection and breeding to generate industrial yeasts with superior aroma production. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6965–6975.
- Stender, H., Kurtzman, C., Hyldig-Nielsen, J.J., Sørensen, D., Broomer, A., Oliveira, K., Perry-O'Keefe, H., Sage, A., Young, B., Coull, J., 2001. Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 938–941.
- Tada, Y., Grossart, H.-P., 2014. Community shifts of actively growing lake bacteria after N-acetyl-glucosamine addition: improving the BrdU-FACS method. *ISME J.* 8, 441–454.
- Tesnière, C., Delobel, P., Pradal, M., Blondin, B., 2013. Impact of nutrient imbalance on wine alcoholic fermentations: nitrogen excess enhances yeast cell death in lipid-limited must. *PLoS One* 8, e61645.
- Torija, M.J., Mateo, E., Guillaumon, J.M., Mas, A., 2010. Identification and enumeration of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan–MGB probes. *Food Microbiol.* 27, 257–265.
- Toulmé, J., Giegé, R., 1998. Les aptamères: des ligands et des catalyseurs oligonucleotidiques obtenus par sélection *in vitro*. *Méd. Sci.* 14, 155.
- Tourdot-Maréchal, R., Gaboriau, D., Beney, L., Diviès, C., 2000. Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 269–273.
- Valera, M.J., Torija, M.J., Mas, A., Mateo, E., 2013. *Acetobacter malorum* and *Acetobacter cerevisiae* identification and enumeration by Real-Time PCR with TaqMan–MGB probes. *Food Microbiol.* 36, 30–39.
- Wallner, G., Amann, R., Beisker, W., 1993. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14, 136–143.
- Walther, A., Hesselbart, A., Wendland, J., 2014. Genome sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the world's first pure culture lager yeast. *G3 Genes Genomes Genet.* 4, 783–793.
- Wang, A., Chen, L., Pu, K., Zhu, Y., 2014a. Identification of stem-like cells in non-small cell lung cancer cells with specific peptides. *Cancer Lett.* 351, 100–107.
- Wang, B., Wang, Q., Cai, Z., Ma, M., 2015. Simultaneous, rapid and sensitive detection of three food-borne pathogenic bacteria using multicolor quantum dot probes based on multiplexed fluorescence immunoassay in food samples. *LWT Food Sci. Technol.* 61, 368–376.
- Wang, C., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., 2014b. Monitoring of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, and *Starmarella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) populations during alcoholic fermentation by fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Food Microbiol.* 191, 1–9.
- West, J.L., Halas, N.J., 2000. Applications of nanotechnology to biotechnology: commentary. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 215–217.
- Wilson, I.G., 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741.
- Xufre, A., Albergaria, H., Inácio, J., Spencer-Martins, I., Gírio, F., 2006. Application of fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 376–384.
- Yamaguchi, T., Kawakami, S., Hatamoto, M., Imachi, H., Takahashi, M., Araki, N., Yamaguchi, T., Kubota, K., 2015. *In situ* DNA-hybridization chain reaction (HCR): a facilitated *in situ* HCR system for the detection of environmental microorganisms. *Environ. Microbiol.* 17, 2532–2541.

4 Moyens de lutte permettant de réduire les altérations dues aux microorganismes

4.1 Méthodes préventives

Différents moyens de prévention, biologiques et physiques existent afin de réduire voire de minimiser fortement les risques de contaminations levuriennes ou bactériennes.

4.1.1 Bonnes pratiques

Concernant les BA, la meilleure prévention à adopter pour éviter leur développement est de maîtriser le contact avec l'O₂. Pour cela différentes techniques peuvent être mises en place telles que l'embouteillage à chaud stabilisant le vin microbiologiquement, le recours aux gaz inertes pour empêcher le vin d'entrer en contact avec l'oxygène, les ouillages réguliers pour réduire la surface de contact possible avec l'oxygène. De plus il est important de maîtriser la température du chai afin de réduire leur développement.

Concernant *Brettanomyces*, Yap et al. (2007) ont montré que l'augmentation des contaminations des vins par cette levure est due à différents critères tels que :

- une évolution de la vinification, avec des vins avec de faibles acidités contenant des teneurs en sucres résiduels non négligeables
- une évolution des pratiques de vinification avec une diminution de l'utilisation de la filtration et du SO₂
- une hygiène relativement pauvre de la cave avec des lavages avec des désinfections de fûts inadéquates
- la propagation entre les vignobles et les régions par l'utilisation de fûts revendus contaminés
- l'importation de vins contaminés.

Le vignoble peut également jouer un rôle puisqu'un raisin de bonne qualité sanitaire peut réduire les risques conduisant à la production de phénols volatils (Loureiro et Malfeita-Ferreira, 2006). De plus, les concentrations en acides hydroxycinnamiques, étant directement responsables de la production de ces composés dépendent du cépage, de sa qualité sanitaire (Oelofse et al., 2008) et

des pratiques de macération (Gerbaux et al., 2002). Ces facteurs, en plus de l'utilisation de pectinases, utilisées pour l'extraction de la couleur et la clarification du moût de raisin, possédant des activités secondaires de type estérase, peuvent conduire à augmenter le niveau de production en phénols volatils par *Brettanomyces* spp. (Dugelay et al., 1993; Gerbaux et al., 2002) par augmentation de la teneur en acides phénols, précurseurs des phénols volatils. *B. bruxellensis* est par contre incapable de métaboliser les acides hydroxycinnamiques estérifiés avec l'acide tartrique (Ginjom et al., 2011). Récemment, un code des bonnes pratiques vitivinicoles destiné à prévenir ou à limiter la contamination par *Brettanomyces* a été mis en place par l'OIV (Résolution OIV-OENO 462-2014).

4.1.2 Méthode biologique

4.1.2.1 Ferments microbiologiques

Une bonne gestion des fermentations, assurée notamment par l'utilisation de ferments pour réaliser la FA et la FML est particulièrement importante en prévention. En effet, les arrêts de FA, les fermentations languissantes et des temps de latence importants entre la FA et la FML créent un environnement où *Brettanomyces* peut alors se développer (Malherbe et al., 2007). Récemment, il a été cependant montré que certaines souches de *Oenococcus oeni* possédaient des activités estérases capables de libérer des acides phénols (Chescheir et al., 2015). S'il y a ensuite une contamination par les levures *Brettanomyces* dans le vin, cela conduit à la production de phénols volatils.

4.1.3 Pratiques œnologiques

4.1.3.1 Collage du vin

Le collage des vins rouges à l'aide de protéines permet d'abaisser significativement la charge microbienne. L'étude de Murat et Dumeau (2003) indique que les populations contaminantes de *Brettanomyces* peuvent être réduites de 40 à 2000 fois lors de traitement avec des protéines de collage.

4.1.3.2 Dicarbonate de diméthyle (DMDC)

Le DMDC est utilisé en œnologie pour assurer la stabilisation microbiologique du vin mis en bouteille et prévenir le développement des levures indésirables et des bactéries lactiques. Il est autorisé par l'Union Européenne pour les vins à plus de 5 g/L de sucres résiduels avant embouteillage à la dose maximale de 200 mg/L. Plusieurs études montrent que les BL en vin (Ough et al., 1988) ou en jus (Delfini et al., 2002; Winniczuk et Parish, 1997) sont plus résistantes au DMDC que les levures. Costa et al. (2008) ont clairement démontré que l'utilisation de ce composé à la concentration limite autorisée n'était pas efficace contre les BL et les BA que ce soit pour des cultures pures ou sur des populations indigènes. Pour des populations levuriennes autour de 10^6 UFC/mL, la dose maximale de DMDC légalement autorisée n'est pas totalement efficace contre les espèces levuriennes les plus résistantes (*S. pombe*, *Brettanomyces* et *S. cerevisiae*). L'addition de 1 mg/L de dioxyde de soufre moléculaire augmente nettement l'effet d'inactivation du DMDC sur les populations de levures initiales (Costa et al., 2008).

4.1.3.3 Chitosane

L'utilisation de chitosane, polysaccharide dérivé de la chitine de *Aspergillus niger*, est autorisée par l'Union Européenne depuis 2010. Ce composé, insoluble dans le vin, possède une action à la fois physique et biologique sur *Brettanomyces*. Pour Taillandier et al. (2014), il y a une agrégation des cellules avec le chitosane suite à des interactions de charges électriques et il provoque également une fuite d'ATP des cellules levuriennes. Il permet de réduire significativement la population levurienne *Brettanomyces* à la dose maximale autorisée de 10 g/hL soit 100 mg/L. La dose recommandée est de 4 g/hL. Ferreira et al. (2013) ont montré que le chitosane inhibe la croissance de *B. bruxellensis* avec des concentrations allant de 200 à 500 mg/L et dépendant du poids moléculaire du chitosane utilisé. Plus le poids moléculaire est faible, plus les concentrations minimales pour inhiber leur croissance est faible. Bağder-Elmacı et al. (2015) ont retrouvé des résultats similaires. De plus, le chitosane ne montre aucun impact en conditions de FA sur la population de *S. cerevisiae* en milieu de culture (Bağder-Elmacı et al., 2015; Gómez-Rivas et al., 2004; Portugal et al., 2013). Lorsque les expérimentations sont effectuées en condition vin, la FA est retardée sans altérer significativement la viabilité de *S. cerevisiae*. Il semblerait même que ce produit puisse jouer un rôle préventif vis-à-vis des *B. bruxellensis* en empêchant le développement de populations contaminantes dans des vins déjà

traités (Nardi et al., 2014; Nazaris et al., 2016). Concernant *Oenococcus oeni*, cette dernière semble plus sensible puisque sa croissance est complètement inhibée à 200 mg/L de chitosane.

4.1.3.4 Acide sorbique

L'activité antifongique de l'acide sorbique a été testée sur différentes levures. Cet acide sous forme de sorbate de potassium est autorisé comme conservateur par l'Union Européenne. La teneur maximale dans le vin traité est fixée à 200 mg/L en acide sorbique. Il semble que la dose de fongicide permettant l'arrêt d'une fermentation soit relativement élevée : 5 g/L. A partir de 0,5 g/L, il est observé simplement un ralentissement de la fermentation qui s'arrête avant la fin (Ribéreau-Gayon et al., 2004).

4.1.3.5 Ozone

Ce composé s'est montré comme un agent désinfectant hautement efficace. Ce composé sous forme de gaz ou de solution est un traitement très efficace puisqu'il élimine 70% des levures (Guzzon et al., 2011). Quand la concentration cellulaire est inférieure à 10^3 cellules/mL dans une solution; l'ozone est capable d'éliminer les microorganismes d'altération du vin. Cependant, quand la concentration cellulaire est plus importante, l'efficacité de l'ozone est moindre (Guzzon et al., 2013). Cantacuzene et al. (2003) ont mis en évidence une réduction de la population de *B. bruxellensis* avec un traitement au gaz ozone et à l'eau chaude mais non avec de l'ozone aqueux. Cependant, Coggan (2003) a mesuré une réduction de 99% de la population de *B. bruxellensis* avec une eau ozonée.

4.1.3.6 Dioxyde de soufre (SO₂)

La méthode la plus utilisée pour éviter les contaminations microbiennes est l'ajout de dioxyde de soufre ou anhydre sulfureux (SO₂). Le sulfitage peut se faire de manière directe par traitement du vin avec l'utilisation de solution sulfureuse, de bisulfite ou de sels d'hydrogénosulfite. La manière indirecte est par traitement des fûts de chêne avec l'utilisation de soufre combustible (mèches ou pastilles) ou d'anhydride gazeux.

Après ajout de SO₂ dans le vin, une partie de ce dioxyde de soufre va se combiner de manière stable à l'éthanal ou de manière instable à d'autres composés carbonylés tandis qu'une autre partie va rester libre (**Fig. 2**).

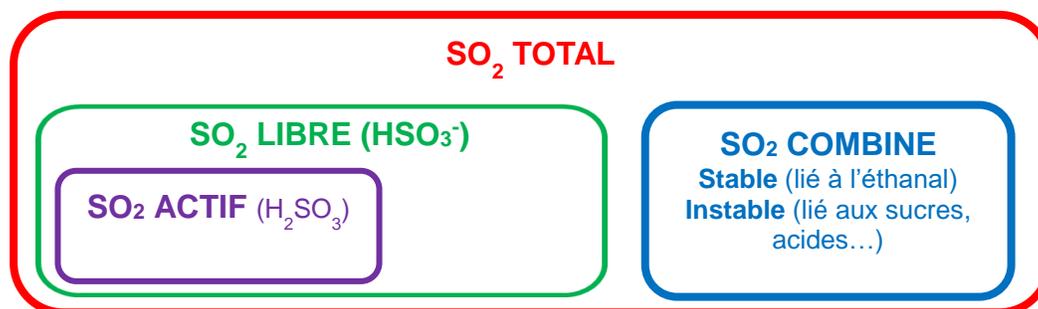


Fig. 2

Répartition des différentes formes du SO_2 en vin.

La combinaison du SO_2 est très variable selon la matrice du vin. Le moyen le plus sûr pour déterminer le taux de combinaison est d'appliquer la méthode de Schaeffer qui consiste à ajouter des doses croissantes de SO_2 au vin afin de tracer la droite de combinaison (Institut Français de la Vigne et du Vin, 2002).

Une fraction seulement du SO_2 libre (H_2SO_3 et HSO_3^-) est dite SO_2 actif ou moléculaire (H_2SO_3). Bien que la forme HSO_3^- soit la plus présente au pH des vins (pH 3 à 4), elle possède une faible activité antiseptique. C'est la forme active ou moléculaire (SO_2 moléculaire) qui présente les plus grandes propriétés antiseptiques mais aussi des propriétés antioxydantes et antioxydasiques (Ribéreau-Gayon et al., 2012).

La quantité de SO_2 moléculaire se calcule en fonction du SO_2 libre, du pH, du titre alcoométrique volumique (TAV) et de la température. De ce fait, la quantité de SO_2 moléculaire diminue lorsque le pH augmente, que le TAV augmente et que la température diminue (Beech et Tomas, 1985; Usseglio-Tomasset et Bosia, 1984).

Actuellement, l'Union Européenne autorise une teneur maximale de 150 mg/L de SO_2 total dans les vins rouges secs et une teneur maximale de 200 mg/L dans les vins blancs secs et rosés secs. Il est important de pouvoir maîtriser la dose de SO_2 dans les vins car une dose excessive conduit à la neutralité de certains arômes et confère des défauts organoleptiques (laine mouillée). Et à l'inverse, une dose insuffisante se caractérise par une oxydation excessive ou à des

développements microbiens pouvant compromettre les qualités organoleptiques du vin (Ribéreau-Gayon et al., 2004).

À dose adéquate, le SO_2 a un effet létal sur les microorganismes, il agit à différents niveaux cellulaires. L'entrée du SO_2 dans la cellule dépend de sa concentration dans le milieu et du pH. Lorsque le pH est bas, la cellule transporte facilement par diffusion le SO_2 moléculaire à l'intérieur (Divol et al., 2012). Le $\text{SO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ n'agit à l'intérieur de la cellule que par l'intermédiaire de l'ion sulfite (SO_3^{2-}) et/ou bisulfite (HSO_3^-). La concentration intracellulaire en SO_2 diminue quand H_2SO_3 se dissocie en HSO_3^- , le SO_2 diffuse de nouveau à l'intérieur de la cellule jusqu'à ce que l'équilibre entre les concentrations intra et extracellulaires s'établisse (Divol et al., 2012). Ce processus entraîne une accumulation intracellulaire de HSO_3^- qui peut réagir sur les constituants de la cellule (Gunnison, 1981). Selon Anacleto et van Uden (1982), la mort des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* par le SO_2 s'effectue en trois étapes:

- le SO_2 moléculaire se combine avec des récepteurs à la surface de la cellule,
- le SO_2 entraîne le changement d'activité du complexe récepteur,
- le SO_2 entraîne des dommages sur la membrane plasmique.

Ainsi, le SO_2 inhibe la croissance microbienne en interférant avec les processus intracellulaires. Le SO_2 est une molécule très réactive et peut se lier à de nombreux métabolites et enzymes dans la cellule (Divol et al., 2012).

Cependant la détermination de la dose de SO_2 actif efficace ainsi que l'évaluation de son efficacité restent complexe car *Brettanomyces* peut être sulfite tolérante (Barata et al., 2008). Cette tolérance est souche dépendante (Curtin et al., 2012) et peut varier jusqu'à cinq fois (Agnolucci et al., 2010; Barata et al., 2008; Curtin et al., 2012). Des concentrations de 0,2 à 0,5 mg/L de SO_2 moléculaire habituellement inhibent la croissance en vins (Barata et al., 2008; Conterno et al., 2006; Du Toit et al., 2005). Cependant, il a été démontré que ce composé entraîne l'état VNC chez certains microorganismes (Agnolucci et al., 2010; Du Toit et al., 2005; Serpaggi et al., 2012) (voir paragraphe 2.6.2.).

Concernant les bactéries, Lafon Lafourcade et Joyeux (1981) ont démontré que les concentrations en sulfite utilisées généralement durant l'élaboration du vin sont insuffisantes pour inhiber la croissance des BA. Ils ont constaté une croissance de *A. aceti* dans du vin rouge contenant 25 mg/L de SO₂ total. Du Toit et al. (2005) ont établi que 1,2 mg/L de SO₂ moléculaire entraîne un effet bactériostatique voire bactéricide sur *A. pasteurianus*, alors que 0,35 mg/L entraîne seulement un effet minime sur la viabilité de cette bactérie. De plus, une inhibition complète de la croissance des BA peut être observée sur le moût de raisin lors de l'addition de 100 mg/L de SO₂ total (Watanabe et Lino, 1984).

Les recommandations de l'Institut Français du Vin stipulent que pour une protection minimale, il suffit de 0,35 mg/l de SO₂ actif tandis que pour une protection maximale, il est recommandé d'avoir 0,60 mg/L de SO₂ actif. Cependant, la restriction des doses autorisées de sulfites dans le vin par la législation Européenne et la réticence de la part des consommateurs d'avoir des teneurs élevées en sulfites du fait des effets indésirables (maux de tête, effet allergisant...) entraînent une certaine difficulté à contrôler ces microorganismes dans le vin.

4.2 Mesures correctives

4.2.1 Méthodes physiques

4.2.1.1 Flash-pasteurisation

La flash-pasteurisation consiste à augmenter fortement la température du vin (entre 65°C et 80°C) pendant quelques secondes afin de diminuer la population en microorganismes sans pour autant altérer les qualités organoleptiques du vin. La valeur moyenne de thermo-résistance des microorganismes dans les vins et les moûts est de 4,5°C. Cette valeur représente l'élévation de la température nécessaire pour réduire au dixième de sa valeur le temps de chauffage agissant sur une population de ce microorganisme. Cependant, cette méthode ne semble pas être aussi efficace que l'utilisation de dioxyde de soufre (Barbin, 2006).

4.2.1.2 Filtration sur membrane

Les membranes avec des pores de 0,45 µm sont utilisées pour l'élimination des levures et des bactéries (Suárez et al., 2007). Cette méthode est largement utilisée dans la pratique bien qu'il semble que certaines bactéries et levures par exemple en état VNC arrivent à passer au travers de cette membrane (Du Toit et al., 2005; Millet and Lonvaud-Funel, 2000; Serpaggi et al., 2012).

Couto et al. (2005) ont montré que ces procédures ne sont pas totalement efficaces. Cependant, des auteurs recommandent d'utiliser une filtration sur membrane de 1,2 µm couplée à l'ajout de 0,5 mg/L de SO₂ actif. Cela permettrait de réduire les populations de toutes les souches testées pour obtenir un vin stable microbiologiquement (Umiker et al., 2013). L'utilisation de cette méthode est donc controversée.

4.2.2 Méthodes chimiques

4.2.2.1 Dioxyde de soufre (SO₂)

En œnologie, le seul traitement chimique curatif envers les différents microorganismes d'altération est l'utilisation de SO₂. Un ajout peut se faire au cours de la vinification ou durant l'élevage du vin (voir paragraphe 4.1.3.6).

4.2.2.2 Lysozyme

Cette enzyme, issue du blanc d'œuf, dégrade la paroi des BL. Cependant, ce produit est sans action les bactéries Gram⁻. A partir de 4 mg/L la destruction des BL est très importante en 24 h, temps nécessaire à la dégradation maximale (Ribéreau-Gayon et al., 2004). Quelle que soit la dose, toutes les cellules ne sont pas détruites et donc une stabilisation complète du vin n'est pas possible. Les principales applications en œnologie sont une inhibition de la FML pour les vinifications en blanc, le retardement du développement des BL et de la FML en vins rouges ainsi que la stabilisation microbiologique des vins après FML même si celle-ci n'est pas complète par le fait que ce composé agit seulement sur les BL et non sur les BA ni les levures.

4.3 Mesures d'avenir?

4.3.1 Méthodes biologiques

4.3.1.1 Toxines actives

Des toxines actives contre *Dekkera* / *Brettanomyces* ont été trouvées. Celles-ci sont synthétisées par *Pichia anomala* (Pikt) et *Kluyveromyces wickerhamii* (Kwkt) (Comitini et al., 2004). Ces toxines ont montré un effet fongicide stable contre *B. bruxellensis* en vin pendant au moins 10 jours. Elles entraînent une mort irréversible de *B. bruxellensis* pour Oro et al., 2016. Santos et al. (2009) ont montré que la toxine PMKT2 produite par *P. membranifaciens* était active et stable au pH et à la température du vin. Cette toxine a montré une activité « killer » contre *B. bruxellensis*.

De plus, il est maintenant connu que le virus *Ustilago maydis* produit également une toxine « killer » (KP6) efficace contre *B. bruxellensis* alors que *S. cerevisiae* est résistante (Santos et al., 2011). Branco et al. (2013) ont mis en évidence une autre toxine produite par *S. cerevisiae* CCMI 885 capable d’agir sur différentes espèces levuriennes dont *B. bruxellensis*. Mehlomakulu et al. (2014) ont montré que *Candida pyralidae* peut sécréter deux toxines (CpKT1 et CpKT2) efficaces contre *B. bruxellensis* mais qui n’inhibent pas *S. cerevisiae* ni *Lactobacillus plantarum* et *Oenococcus oeni*. Une autre toxine (TdKT) produite par la souche *Torulasporea delbrueckii* NPCC 1033 a montré une forte inhibition de croissance de toutes les souches de levures d’altération testées dont *B. bruxellensis* (Villalba et al., 2016). Ces toxines pourraient être dans le futur utilisées comme agent antimicrobien (co-inoculation levurienne, utilisation direct des toxines) durant le vieillissement du vin et lors de son stockage.

4.3.1.2 Peptides antimicrobiens

Des peptides dérivés de lactoferrine (LfcinB17-31 et hydrolase pepsine LF), inhibent la croissance de *B. bruxellensis* en milieu de culture et en vin (Enrique et al., 2008). Cependant il a été démontré que l’efficacité du premier peptide dépend de la souche testée et de la matrice analysée. Nehme et al. (2010) ont mis en évidence dans une fermentation séquentielle (*S. cerevisiae* puis *Oenococcus oeni*) une diminution de la consommation d’acide malique par *O. oeni* en raison de la présence dans le milieu synthétique de peptides inhiteurs (5 à 10 kDa). Liu et al. (2016) ont montré que la FML pouvait être limitée par la présence de peptides soufrés. Rizk et al. (2016) ont récemment montré que cet effet était également vrai en vin (Cabernet Sauvignon et Syrah). Ils ont également démontré que l’activité anti-FML était plus importante lorsque les peptides étaient sécrétés en fin de FA et que ceux-ci inhibaient directement l’activité de l’enzyme malolactique.

Actuellement, il n’y a pas d’étude sur l’effet de peptides vis-à-vis des bactéries acétiques du vin.

4.3.2 Méthodes physiques

4.3.2.1 Haute pression

L’application d’une pression de 400 à 500 MPa durant 5 à 15 min à une température allant de 5 à 20°C peut réduire les populations de certaines levures (incluant *B. bruxellensis*) et des bactéries lactiques et acétiques par plus de 99,99% (Puig et al., 2003) sans engendrer des modifications

majeures des propriétés physicochimiques du vin, de l'activité enzymatique ou des propriétés sensorielles. Morata et al. (2012) ont également démontré qu'un traitement de 100 MPa durant 24 h est très efficace afin de contrôler la croissance levurienne. Ce traitement pourrait donc être une solution d'avenir afin de pallier aux différentes contaminations.

4.3.2.2 Champs électroniques pulsés

Cette technologie consiste à l'application de pulses de courte durée (microsecondes) d'un champ électrique élevé 0,1 à 50 KV/cm entre deux électrodes à température ambiante. Plusieurs études ont montré un effet létal de ce traitement sur des levures et bactéries en milieu liquide (Amiali et al., 2007; Calderón-Miranda et al., 1999; Heinz et al., 2003). Cependant très peu d'études sont réalisées sur milieu vin (Garde-Cerdán et al., 2008). Puértolas et al. (2009) ont établi un traitement permettant de réduire de 99,9% la flore d'altération du moût et du vin sans observer de changements de couleur comme d'odeur.

4.3.2.3 Courant électrique de faible intensité

Ce procédé peut prévenir le développement des levures indésirables *B. bruxellensis* (200 mA durant 60 jours) (Lustrato et al., 2010, 2015). Ce traitement entraîne une modification de la morphologie et de l'intégrité des cellules avec des résultats d'inhibition de cette levure identiques à ceux du SO₂.

4.3.2.4 Ultrason haute puissance

L'utilisation des ultrasons couplée avec une eau de lavage d'au moins 60°C est également capable d'éliminer les levures *B. bruxellensis* inoculées à la surface de bois d'un fût (0 à 2 mm) et jusqu'à 4 mm à l'intérieur du chêne. De plus, ce traitement n'entraîne pas de différence d'extraction des composés du bois dans le vin et ainsi les vins ont été considérés comme identiques par un panel de dégustateurs (Schmid et al., 2011).

4.3.2.5 Microondes

Des traitements courts de microondes (1 min, répété 3 fois) à 3000 Watt ont été testés afin d'éliminer les microorganismes en profondeur (8 mm) des douelles de tonneaux. González-Arenzana et al. (2013) ont montré des diminutions de 36 à 39% pour les levures totales, de 35 à

67% pour *Brettanomyces* et de 91 à 100% pour les BL et les BA en utilisant un temps de traitement très court (3 min). Les intervalles d'efficacité observés viennent de l'origine des bois de chêne avec des porosités variables : *Quercus petraea* de France et *Quercus alba* des USA. Le premier présente plus de porosité entraînant plus de difficultés de désinfection.

4.3.3 Méthodes chimiques

4.3.3.1 Acides gras à chaîne courte (acides C₈ et C₁₀)

Certains acides gras insaturés à longues chaînes (C₁₆ et C₁₈) sont des activateurs de la fermentation alcoolique. Par contre, d'autres acides gras saturés à chaînes plus courtes, en particulier les acides en C₈ et C₁₀, possèdent une action anti-levurienne importante (Lafon-Lafourcade et al., 1984). Ils sont formés par les levures pendant la FA. Donc l'ajout de ces acides pourrait inhiber le développement de *B. bruxellensis* par exemple.

4.3.3.2 Composés phénoliques

Pastorkova et al. (2013) ont étudié le potentiel antimicrobien de 15 composés phénoliques de différentes classes (acides phénols, stilbènes et flavonoïdes) sur les levures et les BA entraînant une altération du vin. Le ptérostilbène, le resvératrol (stilbène) et la lutéoline (flavonoïde) sont les composés présentant un effet inhibiteur important envers tous les microorganismes testés, alors que la myricétine (flavonoïde) et les acides phénols testés (acide férulique et acide *p*-coumarique) ont un effet dépendant des microorganismes testés. Présents naturellement dans le raisin, les stilbènes notamment pourraient être une alternative intéressante afin de réduire l'utilisation des sulfites lors de l'élaboration du vin (Pastorkova et al., 2013).

4.3.3.3 Nanoparticules d'argent

Izquierdo-Cañas et al. (2012) ont étudié l'efficacité de l'argent colloïdal comme une alternative antiseptique au SO₂ en vin blanc et vin rouge. A 1 g/kg de raisin, ce composé était capable de contrôler le développement des BL et des BA sans affecter la croissance de *S. cerevisiae*. La concentration en argent était en vins finis plus faible que la dose limite de 0,1 mg/L proposée par l'OIV. Les vins avaient par ailleurs des compositions chimiques proches malgré une teneur en éthanol légèrement plus faibles que les vins élaborées avec du SO₂.

Chapitre 2

Matériels & Méthodes

1 Les bactéries

1.1 Souches bactériennes utilisées et milieux de croissance

Dans notre étude, 4 espèces différentes de BA ont été utilisées : *Acetobacter aceti* DSM 3508 (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Allemagne); *Acetobacter pasteurianus* CECT 7582 (Colección española de cultivos tipo, Universitat de València, Edificio de Investigación, Burjassot, Espagne); *Gluconobacter oxydans* DSM 7145; *Gluconacetobacter liquefaciens* CIP 103109 (Collection of Institut Pasteur, Biological Resource Center of Institut Pasteur, Paris, France).

Oenococcus oeni sabo11 (souche biotechnologique isolée à partir de vin d'Afrique du Sud) a également été utilisée comme espèce de BL majoritairement présente dans le vin.

Les BA ont été adaptées à l'éthanol par croissance en milieu Mannitol (Gullo et Giudici, 2008) auquel a été additionné de l'éthanol. La composition est la suivante : 2,5% (p/v) de mannitol; 0,5% (p/v) d'extrait de levure; 0,3% (p/v) de peptone, + 5% (v/v) d'éthanol ajouté après autoclavage.

O. oeni a été cultivée quant à elle en milieu FT80 (Cavin et al., 1988). La composition est la suivante : 0,5% (p/v) d'extrait de viande; 0,5% (p/v) d'extrait de levure; 0,5% (p/v) de glucose; 0,35% (p/v) de fructose; 0,1% (p/v) d'acide D,L-malique ; 0,06% (p/v) KH₂PO₄; 0,045% (p/v) de KCl; 0,013% (p/v) de CaCl₂.H₂O; 0,0003% (p/v) de MnSO₄.H₂O; 0,013% (p/v) de MgSO₄.7H₂O et 1 mL de tween 80. Le pH a été ajusté à 5,3. 5% (v/v) d'éthanol pour l'adaptation au milieu vin et du Delvocid (0,005% (p/v) pour inhiber une croissance fongique ont été ajoutés après autoclavage.

Le développement de *Escherichia coli* K12 ER2738 (disponible à partir de New England Biolabs) a été réalisé en milieu LB (Bertani, 1951). La composition est la suivante : 1% (p/v) de peptone, 0,5% (p/v) d'extrait de levure, 1% (p/v) de NaCl, 0,1% (p/v) de glucose.

Ces milieux sont également élaborés sous forme solide en ajoutant 2% (p/v) d'agar avant autoclavage.

Chacune des bactéries utilisées est conservée dans un cryotube composé à 50% de leur milieu de croissance et 50% de glycérol à 40%. A partir de ces cryotubes, les cellules sont isolées sur leur milieu de culture solide puis utilisées afin de réaliser les cultures liquides.

1.2 Conditions de croissance

Concernant leur adaptation, les bactéries sont d'abord cultivées en milieu liquide sans éthanol. Les BA étant aérobies, leur croissance est réalisée en erlenmeyers sous agitation permanente. Alors que la bactérie *O. oeni* étant anaérobie facultative est cultivée en tube Falcon dans un incubateur avec 5% de CO₂.

Les bactéries sont ensuite adaptées à la présence d'éthanol en milieu liquide complété de 5% (v/v) d'éthanol. Ensuite, les inoculations en milieu Mannitol avec 10% (v/v) en éthanol, en vin blanc et en vin rouge sont réalisées grâce aux bactéries adaptées après une semaine à 28°C. Ensuite, toutes les cultures sont effectuées à 28°C.

Le vin rouge utilisé tout au long de ce projet de thèse a été élaboré à partir de raisins issus du cépage Pinot Noir provenant du vignoble de l'Université de Bourgogne. Le vin blanc a été lui élaboré à partir de raisins issus du cépage Chardonnay de ce même vignoble. Les vins ont été stérilisés par filtration sur membrane 0,2 µm (Stericup-GP, polyethersulfone, SCGPU05RE, Millipore Express® Plus Membrane). 200 µL ont été utilisés afin de déterminer le pH et le titre alcoométrique volumique (TAV) de chacun des vins par l'appareil OenoFoss (FOSS™). Cet appareil utilise la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier IR-TF afin de déterminer ces valeurs. Le vin rouge et le vin blanc utilisés lors de notre étude ont respectivement un pH de 3,3 et 3,0 ainsi qu'un TAV de 12,5% et 12,3% respectivement.

1.3 Développement et/ou amélioration des méthodes de quantification

Deux principales méthodes de quantification des BA ont été testées:

- la méthode de cytométrie en flux (CMF) soit après marquage avec des composés permettant la discrimination Gram⁺ / Gram⁻ soit après une hybridation *in situ* en fluorescence (*FISH*)
- la méthode de PCR quantitative (qPCR).

1.3.1 CMF

1.3.1.1 Cytomètre en flux

Le cytomètre en flux utilisé lors de cette thèse est un BD Accuri C6. Ce dernier a deux lasers d'excitation à 488 et 640 nm et 4 filtres d'émission 530±15 nm, 585±20 nm, 675 longPass nm et 675±12 nm.

1.3.1.2 Utilisation du iodure d'hexidium - CMF

Des essais de marquage des bactéries avec de l'iodure d'hexidium ont été menés. Le protocole utilisé est proche de celui utilisé dans les travaux de Mason et al. (1998). Les cellules sont centrifugées (1 mL ; 12 000 g ; 5 min) puis reprises en milieu de culture. Puis, elles sont lavées en PBS 1X (Biosolve, 10X Molecular biology, 162323). 100 µL sont utilisés pour être mis en contact avec le HI (1 µL à 1 mg/mL dans une solution de 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)) (excitation / émission : 518/600 nm) et le SYTO 13 (1 µL à 2 mM en DMSO) (excitation / émission : 488/509 nm). Le HI peut pénétrer dans les cellules Gram⁺ mais non les Gram⁻. Après marquage (15 min à température ambiante), 20 µL avec un débit de 34 µL/min sont analysés par cytométrie en flux (Accuri C6, BD).

1.3.1.3 Utilisation d'une lectine fluorescente - CMF

De plus, des essais utilisant une lectine (Wheat Germ agglutinin ; WGA) couplée au fluorochrome AlexaFluor® 488 (excitation/émission : 495/518 nm) ont été réalisés. Celle-ci va se fixer spécifiquement sur la paroi des bactéries à Gram⁺. Le protocole utilisé est celui mis en place par Holm et Jespersen (2003). Les cellules sont centrifugées (1 mL ; 12 000 g ; 5 min) puis reprises en milieu de culture. Les cultures sont diluées au 1/100 dans une solution tampon (3 M KCl, 0,035 M EDTA, pH ajusté à 7,0) puis 100 µL sont utilisés auxquels sont ajoutés 10 µL de WGA à 200 µg/mL. L'incubation avec la lectine se fait durant 4 min à température ambiante. Les échantillons sont ensuite analysés par CMF.

De plus, des tests ont été menés en testant différentes solutions afin de permettre une désorption des polyphénols adsorbés au niveau de la paroi bactérienne. Les 5 solutions testées sont :

- NaCl 1,5 M
- éthanol 30% (v/v)

- éthanol 50% (v/v)
- éthanol 70% (v/v)
- eau physiologique (NaCl à 0,9 % p/v).

Les cellules ont ensuite été incubées durant 2 h ou 22 h à température ambiante. Une mesure de l'absorbance à 280 nm (A_{280}) grâce à un spectrophotomètre (Shimadzu, UV-1800) a été menée afin de vérifier si une désorption avait eu lieu.

1.3.1.4 FISH-CMF

1.3.1.4.1 Sondes FISH testées

Pour toutes les expérimentations suivantes, les analyses sont effectuées en milieu de culture ou en vin contenant des concentrations proches de 10^6 cellules/mL.

1.3.1.4.1.1 *Sonde Aceto2*

Cette sonde d'une longueur de 20 bases ¹ (5'- TTC GCT CAC CGG CTT AAG GT -3') est reliée au fluorochrome AlexaFluor® 488 en 5'. Elle se fixe spécifiquement sur l'ADN codant l'ARNr 16S et les transcrits de ce gène. C'est cette spécificité qui permettra de discriminer les BA des BL (*O. oeni* par exemple). Cette sonde a un T_m de 59°C. Le T_m représente une température à laquelle statistiquement la moitié des appariements sont réalisés. Si la température d'hybridation est diminuée de 2°C, cela permet d'avoir plus de la moitié des sondes qui s'hybrident. Cependant, plus la température d'hybridation est basse, plus le nombre d'appariements aspécifiques est élevé. La température d'hybridation de cette sonde a donc été fixée à 57°C.



Fig 3.

Schéma d'une sonde d'oligonucléotides conjuguée à un fluorochrome.

1.3.1.4.1.2 *Sonde Aceto2 HRP*

Des expérimentations ont également été menées avec la sonde spécifique Aceto2, associée à l'enzyme peroxydase de raifort (*HRP* : *horseradish peroxidase*) qui, en présence de tyramide couplée au fluorochrome AlexaFluor® 488 (*TSA* : *Tyramide signal amplification*), permet la

¹ http://probase.csb.univie.ac.at/pb_report/probe/1571

libération du fluorochrome et donc une fluorescence (Biegala et al., 2003; Not et al., 2002; Schönhuber et al., 1997; Sekar et al., 2003). Ces sondes permettent une amplification du signal de fluorescence de 10 à 20 fois par rapport à une sonde simplement couplée au fluorochrome. Ainsi, la détection des cellules est grandement améliorée même s'il y a peu d'ARNr dans la cellule.

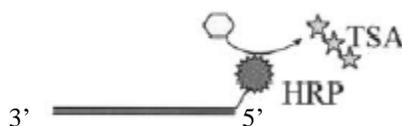


Fig 4.

Schéma d'une sonde d'oligonucléotides conjuguée à une enzyme HRP. L'apport de son substrat conjugué à un fluorochrome permet l'accumulation de ce dernier dans la cellule.

1.3.1.4.2 Mise en place du protocole

Les différents paragraphes suivants présentent un protocole détaillé adapté plus particulièrement à la sonde Aceto2 HRP. Cependant, pour la sonde Aceto2 couplée directement au fluorochrome AlexaFluor® 488, les principaux changements sont les températures d'hybridation de la sonde et l'apport de la tyramide couplée au fluorochrome qui n'a pas lieu dans ce cas du fait du couplage direct du fluorochrome avec la sonde fluorescente.

1.3.1.4.2.1 *Désorption des polyphénols*

Cette étape n'est pas obligatoire et n'est pas toujours réalisée. Deux méthodes sont testées afin d'éliminer la probable interaction entre la sonde et les polyphénols adsorbés au niveau de la membrane des BA en vin rouge. Pour cela 1 mL de matrice contenant environ 10^6 cellules/mL est centrifugé (12 000 g durant 10 min) pour ensuite réaliser:

- une désorption via un prétraitement à l'hexaméthaphosphate à pH 8,5 suivi d'un passage aux ultrasons 2 x 35 s (5s spin on – 5s spin off) (BioBlock Scientific, VibraCell, 75042).
- deux traitements de 30 min à température ambiante au polyvinylpolypyrrolidone (polymère organique ayant une forte affinité pour les polyphénols) (concentration finale 1% (p/v)) suivie d'une centrifugation à 12 000 g durant 10 min.

1.3.1.4.2.2 Fixation

Après centrifugation, une étape de fixation a été testée avec l'ajout de 1 mL d'une solution de paraformaldéhyde à 4% (p/v) durant 20 min à 37°C. Certaines expérimentations ont été réalisées avec une fixation avant la perméabilisation puisque les deux cas peuvent être retrouvés dans la littérature. Les cellules sont ensuite centrifugées (12 000 g durant 10 min).

1.3.1.4.2.3 Perméabilisation

Afin de perméabiliser les cellules, plusieurs essais sont réalisés :

- 1 mL d'une solution de PBS/Triton (0,5 g/L (p/v)) pendant 10 min à 4°C
- 1 mL d'une solution à 50% v/v d'éthanol + 50% de PBS 1X durant 10 min à -20°C.
- 1 mL d'une solution contenant : lysozyme (1 mg/mL), Tris-HCl (100 mM) et de EDTA (50 mM) à pH 8, mise à 37°C pour une incubation de 40 min ou 24 h.

Puis une centrifugation à 12 000 g durant 5 min est effectuée.

1.3.1.4.2.4 Hybridation

Pour l'hybridation avec la sonde HRP, différents paramètres sont testés. Tout d'abord pour le tampon d'hybridation (1 mL), trois compositions sont essayées :

- 0,9 M (p/v) de NaCl; 20 mM (p/v) de Tris-HCl; 0,1% (p/v) de SDS
- 0,9 M (p/v) de NaCl ; 20 mM (p/v) de Tris-HCl ; 0,1% (p/v) de SDS + 10% (p/v) de dextrane sulfate
- 0,9 M (p/v) de NaCl ; 20 mM (p/v) de Tris-HCl ; 0,1% (p/v) de SDS + 0,5 mg/mL d'ADN de sperme de saumon.

Puis, une fois les cellules reprises dans 1 mL de tampon d'hybridation, la sonde HRP est ajoutée. Afin de trouver la température d'hybridation optimale, un gradient de température est testé allant de 30°C à 57°C.

Pour l'hybridation, 1 µL de sonde est ajouté aux 100 µL de solution de bactéries en tampon d'hybridation. Plusieurs concentrations initiales de sonde sont utilisées : 18 µM ; 1,8 µM et 0,18 µM. Le mélange est incubé durant 2 h au bain-marie.

1.3.1.4.2.5 *Lavage*

Afin d'éliminer l'excès de sonde, un lavage est effectué dans 1 mL de tampon de lavage (100 mM de Tris-HCl ; 150 mM de NaCl) après centrifugation à 12 000 g durant 5 min et élimination du surnageant. Plusieurs conditions sont essayées :

- absence de lavage
- à température ambiante durant 15 min
- pendant 30 min à 55°C, 60°C et 70°C.

1.3.1.4.2.6 *Ajout de la tyramide couplée à l'AlexaFluor® 488*

Après 5 min de centrifugation à 12 000 g, le surnageant est éliminé et 100 µL de tampon TNT à pH 5 sont ajoutés (100 mM Tris-HCl ; 150 mM NaCl ; 0,05% (v/v) Tween 20). 10 µL de tyramide signal amplification TSA™ Reagent, AlexaFluor® 488 Tyramide (tampon d'amplification + tyramide, T20948) sont ajoutés. Deux concentrations initiales différentes sont testées :

- dilution de la tyramide-AlexaFluor® 488 dans le tampon d'amplification au 1/50.
- dilution de la tyramide- AlexaFluor® 488 dans le tampon d'amplification au 1/10.

L'incubation avec le « TSA mix » est faite à différentes températures allant de 30°C à 57°C et durant différents temps : 30 min, 1 h, 1 h 30 ou 2 h.

Un premier passage au cytomètre est effectué afin de vérifier la présence de fluorescence et donc la fixation de la sonde.

1.3.1.4.3 Lavage

Une centrifugation durant 10 min à 12 000 g a ensuite été effectuée pour éliminer la tyramide en excès responsable du bruit de fond. Le surnageant est jeté et 100 µL de tampon de lavage (0,9 M NaCl ; 20 mM Tris-HCl) sont ajoutés afin d'effectuer la quantification du signal d'amplification par cytométrie en flux.

1.3.1.4.4 Quantification du signal d'amplification par cytométrie en flux

Les échantillons obtenus sont ensuite analysés par cytométrie en flux. L'analyse se fait grâce à :

- 20 µL par échantillon avec un seuil en FSC-H à 10 000 (unité relative)

- la détection de l'émission de fluorescence du fluorochrome AlexaFluor® 488 par le filtre FL1 (530 ± 15 nm) du cytomètre en flux.

Afin de pouvoir analyser les résultats de façon optimale, il faut avoir entre 100 et 1000 évènements par μL (soit 10^5 à 10^6 cellules/mL).

1.3.2 qPCR

La seconde technique testée afin de quantifier les BA est la PCR en temps réel (qPCR).

1.3.2.1 Enumération des BA présentes (Méthode de référence)

Après croissance des BA en milieu éthanol 10%, en vin blanc ou en vin rouge, les populations présentes ont été dénombrées par cytométrie en flux (CMF). Cette méthode est ici considérée comme la méthode de référence puisque plusieurs études ont montré que le dénombrement sur boîtes de Pétri n'est pas approprié pour déterminer les populations de BA en milieu stressant comme le vin (Bartowsky et al., 2003; Millet et Lonvaud-Funel, 2000; Sievers et al., 1992; Sokollek et al., 1998; Trček, 2005). Pour ce dénombrement, 1 mL d'échantillon est centrifugé à 12 000 g durant 5 min puis repris dans 1 mL PBS 1X (Biosolve, 10X Molecular biology, 162323). Puis, 3 μL du fluorochrome DiBAC4(3) (Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid) Trimethine Oxonol) (ThermoFisher Scientific, Molecular Probes™, B-438, dilué en DMSO) ont été ajoutés (concentration finale : 6 μM). Ce composé est excité par le laser à 488 nm. La fluorescence émise est collectée par le filtre FL1 du cytomètre en flux. Ce marqueur est utilisé comme contre coloration et permet de contourner le potentiel problème de la non détection des cellules en état VNC liée à la méthode culture dépendante (Millet et Lonvaud-Funel, 2000). Trois répétitions ont été effectuées pour chaque échantillon et 20 μL avec un débit de 34 $\mu\text{L}/\text{min}$ ont été analysés avec le cytomètre en flux.

1.3.2.2 Témoin interne

Dans cette étude, *E. coli* K12 ER2738 a été utilisé comme témoin interne. Ce dernier permet de valider l'extraction de l'ADN ainsi que de déterminer si une inhibition de PCR a lieu lors de la quantification. Ce genre de témoin est de plus en plus utilisé en milieu vin puisqu'il est connu que de nombreux inhibiteurs peuvent opérer durant l'étape d'amplification de l'ADN. Cette bactérie a été choisie puisqu'elle n'est pas présente en vin.

Une courbe de corrélation (C_q /concentration) a été réalisée en milieu de culture LB à des concentrations de 10^1 à 10^7 cellules/mL. L'extraction a été effectuée par un kit InstaGene™ Matrix (Bio-Rad) suivant les recommandations du fabricant. Les amorces spécifiques EC23S ont été sélectionnées pour la quantification (Forward: 5'-CATAAGCGTCGCTGCCG-3'; Reverse: 5'-AAAGAAAGCGTAATAGCTCACTGGTC-3') (Chern et al., 2011; Ludwig et Schleifer, 2000).

Concernant les échantillons de vin, 20 μ L du témoin interne à 5.10^5 *E. coli*/mL ont été ajoutés dans 1 mL d'échantillon avant d'extraire l'ADN pour obtenir une concentration finale très proche de 10^4 *E. coli*/mL ($9,8 \cdot 10^3$ cellules/mL).

1.3.2.3 Extraction de l'ADN

Après croissance des BA et addition du témoin interne dans chaque échantillon, deux extractions d'ADN ont été testées (voir protocoles détaillés en Annexes) :

- la méthode Ausubel (Ausubel et al., 1992) (Annexe 1) utilisant un tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM disodium EDTA, pH 8,0), du SDS 10%, de la protéinase K, une solution de NaCl à 5 M, une solution CTAB/NaCl (10% CTAB dans 0,7 M NaCl), du chloroforme/alcool isoamylique, une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique et une solution d'éthanol à 70% (v/v)
- la méthode Lipp (Lipp et al., 1999) (Annexe 2) utilisant un tampon CTAB (20 g/L CTAB, 1,4 M NaCl, 0,1M Tris/HCl, 20 mM EDTA), de la protéinase K, du chloroforme, une solution de précipitation au CTAB (5 g/L CTAB, 0,04 M NaCl), une solution de NaCl 1,2 M, de l'isopropanol et une solution d'éthanol à 70% (v/v).

Ces deux techniques utilisent le CTAB (bromure de cetyltriméthylammonium) comme recommandé par Jara et al. (2008). Le premier est le plus utilisé lors de l'extraction d'ADN des BA. Le second convient pour l'extraction et la purification de l'ADN de végétaux et d'aliments tirés de végétaux et convient particulièrement pour la suppression des polysaccharides et des composés phénoliques qui affectent la pureté de l'ADN et donc sa qualité. Cette procédure a été largement appliquée dans la génétique moléculaire des végétaux et a déjà été testée dans des essais de validation dans le but de détecter les OGM (Lipp et al., 1999, 2001). Plusieurs autres

variantes ont été élaborées dans le but d'adapter la méthode à une vaste plage de matrices alimentaires brutes et transformées, comme le maïs (Hupfer et al., 1998), la bière (Hotzel et al., 1999), le soja (Meyer et Jaccaud, 1997) et le lait (Poms et al., 2001).

De plus, l'influence du PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) à une concentration finale de 1% (*p/v*) a été testée. L'ajout a été effectué dans le tampon de lyse (100 µL de PVPP à 10% (*p/v*) dans 1 mL d'échantillon) après la centrifugation initiale des cellules. Une extraction a été effectuée pour chacune des bactéries en milieu de culture avec 10% (*v/v*) d'éthanol, en vin blanc et en vin rouge. Trois répétitions ont été effectuées avec trois reproductions différentes dans le temps.

1.4 Quantification des BA par qPCR

Afin d'amplifier et donc de quantifier les BA, les amorces développées par Valera et al. (2015) ont été utilisées. Celles-ci permettent une amplification d'une séquence du gène codant l'ARN ribosomique 16S (AAB-F : 5'-TGAGAGGATGATCAGCCACACT-3' ; AAB-R : 5'-TCACACACGCGGCATTG-3'), amorces synthétisées par Eurogentec® (France). Ces amorces n'amplifient pas les différentes levures testées, ni les BL et ni d'autres bactéries comme *E. coli* et cela *in silico* comme en conditions de laboratoire (Valera et al., 2015). Le mix PCR a été préparé avec un volume final de 25 µL avec 100 nmoles de chaque amorce et 5 µL d'ADN extrait. Les amplifications ont été faites en triplicat dans un thermocycler CFX96 (Bio-Rad) dans les conditions suivantes : 95°C pendant 10 min, 40 cycles de dénaturation à 95°C durant 15 s et 62°C durant 1 min.

Pour tester la qualité de l'amplification, un traitement BSA (albumine de sérum bovin) et PVP (polyvinylpyrrolidone) durant la qPCR à 400 ng/µL et 0,5% (*p/v*) respectivement ont été réalisés, comme Tessonnier et al. (2009). Un contrôle sans traitement a également été effectué. Le cycle de quantification (C_q) où la première détection de fluorescence se produit a été déterminé automatiquement par le logiciel Bio-Rad CFX Manager par « régression ».

1.5 Détermination de l'acidité volatile selon la population de BA

La croissance des BA ainsi que la production d'acide acétique ont été suivies au cours du temps en milieu Mannitol additionné de 10% (*v/v*) d'éthanol. La concentration en acide acétique (g/L) a été mesurée grâce à un kit enzymatique (Biosentec Cat. No 021) selon les instructions du

fabricant. La population de BA a été déterminée au cours de leurs croissances par dénombrement sur boîte de Pétri en milieu Mannitol (UFC/mL).

Une même expérience a été menée sur un vin rouge issu du domaine de l'Université de Bourgogne mais sans inoculation bactérienne initiale, donc la contamination par les BA a été naturelle. Pour cette expérimentation, la population de BA a été déterminée par qPCR et par CMF. Cette dernière permet de déterminer la quantité totale de la population bactérienne. Un dénombrement des BL sur milieu FT80 a également été effectué afin d'éviter la surestimation de la population de BA par cytométrie en flux.

De plus, 15 vins rouges en bouteille, issus de différentes régions viticoles, ont été analysés par CMF, qPCR et la concentration en acide acétique a également été déterminée.

2 Les levures

2.1 Souches levuriennes et milieux de croissance

Afin de permettre une quantification valide de *B. bruxellensis*, différentes levures ont été utilisées afin de vérifier la spécificité des méthodes mises en place. Il s'agit de *Zygosaccharomyces bailii* MUCL 27812 (Mycothèque, de l'Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgique), *Candida vini* MUCL 27720, *Pichia membranifaciens* PMmb2000 (Collection IUVV), *P. fermentans* PFmb2005 (collection IUVV) et une souche commerciale de *Saccharomyces cerevisiae* FERMOL-PB2023. Leur croissance a été effectuée en milieu YPD modifié contenant 2% (p/v) glucose; 0,5% (p/v) extrait de levure, 1% (p/v) peptone avec 0,02% (p/v) de chloramphénicol ajouté après stérilisation.

Différentes souches de *Brettanomyces bruxellensis* ont également été utilisées. Certaines ont été isolées par l'Institut Technique de la Vigne et du Vin (Beaune, France) telles que LO2E2, LO2E6. Deux autres souches CRB Oeno LO417 et GSLEV17 ont été utilisées et sont issues respectivement de la collection de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (Bordeaux, France) et de Inter-Rhône (Interprofession des vins AOC Côtes du Rhône et de la vallée du Rhône, Orange, France).

2.2 Conditions de culture

Pour adapter les levures au milieu vin, deux adaptations ont été réalisées.

La première, effectuée afin d'avoir une biomasse relativement rapidement, consistait à inoculer des levures en phase stationnaire en milieu YPD supplémenté avec 5% (v/v) d'éthanol. Après 24 h d'incubation à 28°C, les cellules sont transférées dans un nouveau milieu de culture YPD supplémenté avec 10% (v/v) d'éthanol. Après une incubation de 24 h à 28°C, les cellules sont transférées en vin rouge. Comme pour les bactéries, le vin rouge est élaboré à partir de raisin de cépage Pinot Noir issu du vignoble de l'Université de Bourgogne (pH : 3,3 ; TAV : 12,5%) stérilisé par filtration (0,2 µm).

La seconde adaptation a été mise en place pour l'étude sur la résistance de *B. bruxellensis* au SO₂ en vin rouge. Cette adaptation consistait à une première culture en milieu YPD supplémenté avec 5% (v/v) d'éthanol. Lorsque les cellules ont atteint leur phase stationnaire, les cellules sont inoculées à un vin rouge dilué au ½ avec de l'eau physiologique (NaCl 0,9% (p/v)). Les levures sont ensuite incubées durant une semaine à 28°C et c'est à partir de cette culture que le vin rouge est inoculé.

Brettanomyces bruxellensis est dénombré grâce au milieu sélectif ITV (Gerbaux et al., 2000) (10 g/L extrait de levure, 20 g/L bacto-peptone, 20 g/L glucose, 0,1 g/L acide *p*-coumarique, 0,1 g/L acide férulique, 0,03 g/L vert de bromocresol, 0,2 g/L chloramphénicol, 0,006% (p/v) cycloheximide, 20 g/L agar; le pH est ajusté à 5). Une incubation durant une semaine à 28°C est nécessaire avant de dénombrer les colonies.

Concernant *Saccharomyces cerevisiae*, le dénombrement a été fait en milieu YPD solide après une incubation de 2 jours à 28°C.

2.3 Méthodes de quantification

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL



2.3.1 Etude interlaboratoires de la quantification de *B. bruxellensis* par des kits commerciaux en vin rouge

2.3.1.1 Participants et équipements

Trois laboratoires ont été sélectionnés afin de participer à une étude interlaboratoires de quantification de *B. bruxellensis* en vin rouge par des kits commerciaux de qPCR :

- le service technique d'Inter-Rhône (Orange, France)
- Microflora de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (Bordeaux, France)
- le laboratoire de recherche VALMiS de l'UMR PAM (Dijon, France).

Le premier laboratoire utilise un système de quantification iCycler Bio-Rad IQ5, alors que les deux autres laboratoires utilisent un CFX96 Bio-Rad. La détection du cycle où est mesurée une

première fluorescence (C_q) est déterminée automatiquement par le logiciel Bio-Rad CFX Manager® par une méthode de « régression ».

2.3.1.2 Conditions

Chaque laboratoire a utilisé une souche de *B. bruxellensis* afin de contaminer artificiellement du vin rouge de sa région respective. Inter-Rhône, Microflora et VALMiS ont utilisés les souches GSLEV17, IOEB LO417 et LO2E6 respectivement. Le vin rouge utilisé était issu de chacune des régions viticoles (Côtes du Rhône, Bordeaux, Bourgogne) et chacune des levures adaptées a été inoculée à 4 concentrations différentes (niveaux 10^2 , 10^3 , 10^4 et 10^5 cellules/mL). De plus, 5 vins potentiellement contaminés ont également été analysés par les trois laboratoires. Dans cette étude, les laboratoires sont appelés Laboratoire 1, Laboratoire 2 et Laboratoire 3, pour ne pas faire de relations entre les résultats et le laboratoire qui a mené l'expérimentation.

2.3.1.3 Enumérations de *B. bruxellensis*

2.3.1.3.1 Méthode de référence

Dans cette étude interlaboratoires, la méthode de référence est le dénombrement sur boîte de Pétri. La population de chaque échantillon a donc été quantifiée après développement sur milieu sélectif ITV et incubation durant une semaine à 28°C.

2.3.1.3.2 Méthode alternative

Dans notre étude, la méthode alternative est le dénombrement de *B. bruxellensis* par des kits commerciaux de qPCR. Trois kits ont été testés que l'on appellera Kit 1, Kit 2 et Kit 3 afin de ne pas faire de discrimination entre les marques. Les protocoles d'extraction et d'amplification ont été réalisés selon les instructions des fabricants. Pour deux kits, une droite étalon a dû être réalisée alors que pour un des kits, la quantification de *B. bruxellensis* est effectuée directement selon le résultat d'amplification. Chaque laboratoire a testé 2 kits, donc chaque échantillon a été analysé par un kit identique par deux laboratoires différents.

Pour tester si les kits commerciaux amplifient les cellules mortes de *B. bruxellensis*, des vins rouges des Côtes du Rhône, de Bourgogne et de Bordeaux, contenant *B. bruxellensis*, ont été supplémentés avec une importante concentration en mSO_2 (> 2 mg/L). Une quantification par les

kits des levures présentes ainsi que la cultivabilité des cellules ont été effectuées après 2 semaines d'incubation.

2.3.1.4 Construction des profils d'exactitude et analyses statistiques

La construction des profils d'exactitude a été menée comme dans l'étude de Boubetra et al. (2011). Brièvement, un critère d'acceptabilité a été défini à $\pm 0,3$ log cellules/mL pour la méthode alternative. Les valeurs cibles, étant les médianes des résultats obtenus par la méthode de référence, ont été déterminées. Pour chaque niveau cellulaire, l'écart type de reproductibilité (s_R), l'intervalle de tolérance attendu (β -ETI), les limites d'acceptabilité (λ) et la différence entre la valeur de la population par qPCR et la valeur cible (*Biais*) ont été déterminées. Ces différentes valeurs permettent la construction d'un profil d'exactitude pour chaque vin et chaque kit.

L'écart type de reproductibilité (s_R) est calculé grâce à l'écart type entre les triplicat (s_r) et l'écart type entre les laboratoires (s_L) :

$$s_R = \sqrt{s_r^2 + s_L^2}$$

L'intervalle de tolérance attendu (β -ETI) est défini comme un intervalle qui couvre un pourcentage moyen de la distribution des variables. Par exemple, le β -ETI est calculé pour contenir 80% des futures mesures, en moyenne. Le β -ETI peut être exprimé comme :

$$\bar{x} \pm k_M \times s_r$$

où k_M est le facteur de couverture, donné par l'équation :

$$k_M = Q_t \left(v, \frac{1 + \beta}{2} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{I \times J \times G^2}}$$

où s_r est l'écart type de répétabilité, Q_t est le percentile de la distribution du test de Student, β est la probabilité choisie (80% dans cette étude), I est le nombre total de laboratoires, J est le nombre de réplicas, v est le nombre de degré de liberté, et G est donnée par l'équation :

$$G = \sqrt{\frac{H + 1}{J \times H + 1}}$$

où $H = s_L^2 / s_r^2 = s_R^2 / s_r^2 - 1$, s_R^2 est la variance de reproductibilité et s_r^2 la variance de répétabilité. Le nombre de degré de liberté, v , est donné par l'équation :

$$v = \frac{(H - 1)^2}{\frac{H + \frac{1}{J}}{I - 1} + \frac{1 - \frac{i}{J}}{I \times J}}$$

où i est le nombre de laboratoires réalisant l'expérimentation donnée ($1 < i < I$).

2.4 Etude de la résistance de *B. bruxellensis* au dioxyde de soufre

2.4.1 Conditions expérimentales

Pour cette partie de l'étude, les souches LO2E2 et CRB Oeno LO417 ont été adaptées au vin par croissance en vin rouge additionné à 50% (v/v) avec de l'eau physiologique (voir paragraphe 2.2. de ce chapitre).

Les expérimentations ont été menées en bouteille de 120 mL avec bouchon avec un septum en silicone afin de faire des prélèvements stériles en utilisant une seringue. Ce système prévient l'oxygénation du vin en remplaçant le volume prélevé par du gaz Argon. Chaque condition a été réalisée en triplicat et l'incubation est faite à 22°C.

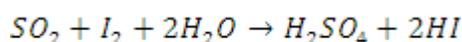
2.4.2 Détermination du SO₂ libre en vin rouge

La méthode de Ripper (titration iodométrique) couplée à une sonde voltmètre et un ampèremètre (Mettler Toledo, DM143-SC; électrode double platine) a été utilisée pour déterminer le SO₂ libre dans le vin rouge en utilisant un titrateur (Mettler Toledo, DL50). L'électrode a un courant imposé de 1 µA qui mesure l'évolution du potentiel, ce qui permet de suivre la variation des concentrations en électrolytes au cours du dosage. La méthode a été optimisée au laboratoire.

La titration de la solution d'iode utilisée est effectuée chaque jour d'analyse. Pour cela, une solution de Na₂S₂O₃ de concentration connue est utilisée (1 mL à 0,1 M est ajouté à 50 mL d'eau

distillée). A cela est ajouté 1,33 mL d'iodure de potassium à 30% permettant de stabiliser la solution ainsi que 2 mL de H₂SO₄ au 1/3 permettant d'acidifier le milieu.

Une fois la titration de l'iode effectuée, la titration des échantillons peut alors être menée. Le dosage du SO₂ libre est effectué dans 50 mL de vin. Les mêmes solutions précédemment utilisées sont ajoutées à l'échantillon. L'apparition d'un courant électrique dans l'échantillon est détectée à l'aide d'une électrode double de platine. La mesure est arrêtée lorsque la solution oxydante d'iode se trouve en excès et donc que tout le SO₂ présent dans l'échantillon a été oxydé en SO₄²⁻. Le volume d'iode obtenu permet alors de calculer la concentration en SO₂ selon la formule suivante:



$$N_{SO_2} = \left(N_{I_2} \times V_{I_2 \text{éq}} \right) \div V_{\text{vin}}$$

avec N en équivalent réducteur ou oxydant par L (Eq/L) et V en mL.

Une courbe de corrélation a été effectuée entre le SO₂ total ajouté et le SO₂ libre retrouvé après une nuit d'incubation (temps pendant lequel la combinaison du SO₂ ajouté avec des molécules du vin telles que sucres, éthanal... se fait). Pour chaque vin utilisé, une courbe de corrélation a été réalisée du fait des différences de combinaison pouvant être relativement importantes entre les vins.

Dans nos conditions, 25, 36 et 43 mg/L de SO₂ total ont été ajoutés en vin rouge à partir d'une solution de SO₂ à 5% (p/v) afin d'obtenir 10, 16 et 20 mg/L de SO₂ libre respectivement. Le SO₂ moléculaire de notre vin peut alors être calculé grâce à l'algorithme sur le site internet de l'IFV² demandant d'indiquer les valeurs de SO₂ libre, le pH, la température et le TAV de notre vin. Nous avons donc respectivement 0,5, 0,9 et 1,1 mg/L de SO₂ moléculaire dans nos conditions.

De plus, des essais ont été menés afin d'analyser le comportement des cellules lorsque le stress sulfite est levé. Pour éliminer l'impact du SO₂ moléculaire sur les levures, le pH a été augmenté

² <http://www.vignevin-sudouest.com/services-professionnels/formulaires-calcul/so2-actif.php>

jusqu'à 4 avec NaOH 10 M (300 μ L par bouteille de 120 mL) pour réduire la concentration en mSO_2 proche de 0 mg/L.

2.4.3 Suivi de croissance

Les cellules en phase stationnaire adaptées au vin ont été utilisées afin d'inoculer le vin rouge à 10^3 , 10^4 et 10^5 cellules/mL. Le SO_2 a été ajouté au moment de l'inoculation. Pour chaque jour d'analyse, 2,5 mL ont été prélevés.

2.4.3.1 Cultivabilité

Un dénombrement sur milieu ITV gélosé a été effectué. Pour cela 100 μ L de vins contaminés ainsi que les dilutions en cascade effectuées sont étalées.

2.4.3.2 Viabilité cellulaire

Concernant la viabilité cellulaire, l'activité enzymatique a été mesurée par un marquage au FDA (voir protocole décrit précédemment 2.3.1.5).

2.4.4 Détermination de la perméabilité cellulaire

Un suivi de la perméabilité cellulaire a également été effectué au cours du temps par le marqueur fluorescent PI (voir protocole décrit précédemment 2.3.1.3).

2.4.5 Détermination de la taille des levures

La taille cellulaire relative est déterminée par le cytomètre en flux et plus particulièrement par la valeur médiane de la lumière diffractée (Forward Scatter) (unité relative). Les ratios entre la taille des levures à un temps donné et la taille initiale ont été calculés au cours du temps.

2.4.6 Dosage du 4-éthylphénol (4-EP) par UHPLC

Une mesure de la concentration en 4-EP a été effectuée au cours du temps. La méthode développée, adaptée et optimisée au laboratoire suite à différentes études trouvées dans la littérature (Larcher et al., 2007; Nicolini et al., 2015) permet le dosage de ce composé sans préparation de l'échantillon. Dans notre étude, 500 μ L de vin rouge contaminé ont été centrifugés à 9 000 g durant 5 min à température ambiante afin d'éliminer les levures et récupérer seulement

le surnageant avant de faire les analyses. L'équipement utilisé était un système HClass UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography; Waters) équipé d'un détecteur de fluorescence. La colonne utilisée était une Coreshell Raptor ARC-18 (2,7 μm ; 100 x 3,0 mm; 9314A1E). En conditions optimales, le four est thermostaté à 30°C et la chambre à échantillon à 8°C. 2 μL de chaque échantillon ont été injectés. Deux solvants ont été utilisés (A et B). Un mélange eau-acétonitrile-acide formique 100 :1,25 :0,05 (v/v) a été utilisé comme solvant A et un mélange acétonitrile-acide formique 100 :0,01 (v/v) comme solvant B. La méthode optimisée a consisté en un gradient progressif comme suit : 32% B (0-1,5 min), 35% B (1,5-2 min), 100% B (2-5 min). Cela a été suivi par une période de 6 min en conditions initiales avant injection de l'échantillon suivant. Le débit a été fixé à 1,3 mL/min. l'excitation des composés a été faite à 280 nm avec une détection à 305 nm. L'analyse des données et l'intégration des pics ont été effectuées grâce au logiciel Waters Empower II. La quantification de 4-EP a été mesurée par comparaison de l'aire sous la courbe obtenue pour un échantillon et la courbe étalon. Cette dernière a été effectuée avec des concentrations en triplicat de 0,1 à 2 mg/L en 4-EP ($r^2=0.9906$). L'identification du 4-EP observée est basée sur le temps de rétention comparé à celui du standard testé.

Chapitre 3

*Quantification des bactéries
acétiques en vin rouge*

Comme expliqué précédemment, les bactéries acétiques (BA) sont les principales bactéries d'altération du vin pouvant entraîner un réel problème économique pour les producteurs de vins. Donc, la quantification précise et sensible de ces bactéries est très importante. Si à l'heure actuelle des techniques existent, les méthodes sont principalement mises en place en milieu de culture synthétique et non directement sur des échantillons de vin. Elles utilisent dans la majorité des cas la méthode de PCR en temps réel et présentent des sensibilités plus ou moins importantes selon les travaux publiés dans la littérature. Ces méthodes d'analyse sont mises en place puisque ces bactéries montrent des croissances relativement faibles sur milieu de culture lorsqu'elles sont issues d'un milieu stressant comme le vin (Bartowsky et al., 2003; Millet et Lonvaud-Funel, 2000; Sievers et al., 1992; Sokollek et al., 1998; Trček, 2005).

C'est pourquoi, dans un premier temps, nous nous sommes orientés vers le développement d'une méthode simple, rapide et sensible permettant de quantifier les BA directement en vin rouge par cytométrie de flux. Tout d'abord, des tests ont été menés en utilisant des fluorochromes et une sonde fluorescente spécifique des BA couplée à la cytométrie en flux (CMF). La CMF présente de nombreux avantages par le fait qu'elle permet d'analyser la taille, la granulosité ainsi que la fluorescence de chacune des cellules (voir Revue en paragraphe 3. de la partie synthèse bibliographique).

Malgré de nombreux développements de protocoles, aucune méthode satisfaisante de dénombrement spécifique des bactéries acétiques en vin rouge par CMF n'a pu être proposée. Ainsi, la suite des expérimentations s'est orientée vers la mise en place d'une quantification par PCR en temps réel (qPCR) et cela directement en vin rouge.

Dans la première partie de ce chapitre, les résultats obtenus avec les différents tests mis en place par cytométrie en flux couplée à l'utilisation de marqueurs fluorescents et d'une sonde FISH spécifique des BA sont présentés. La seconde partie de ce chapitre est consacrée à la mise au point de la quantification des BA par qPCR en vin rouge (sous forme d'un article publié dans *Frontiers in Microbiology*).

1 Par marquages fluorescents couplés à la cytométrie en flux (CMF)

1.1 Utilisation de marqueurs spécifiques pour la discrimination des bactéries Gram⁺/ Gram⁻

1.1.1 Iodure d'hexidium - CMF

Afin de discriminer les BA (Gram⁻) de *O. oeni* (Gram⁺), principale BL retrouvée en œnologie, le marqueur HI a été utilisé. Suite au protocole de Mason et al. (1998), une discrimination entre *A. aceti* et *O. oeni* a été mise en évidence en milieux de culture (respectivement en milieu Mannitol pour les BA et milieu FT80 pour la BL). Un mélange des milieux contenant les deux types de bactéries a été effectué avant analyse (**Fig. 5**).

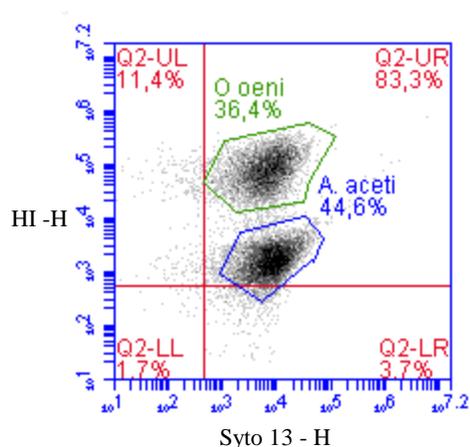


Fig. 5

Discrimination par cytométrie en flux de A. aceti et O. oeni suite à une croissance en milieu de culture après marquage au Syto 13 (concentration finale : 20 μ M) et à l'iodure d'hexidium (concentration finale : 10 μ g/mL) (15 min à température ambiante) en utilisant les filtres d'émission de fluorescence verte (530 \pm 15 nm) (axe des abscisses; Syto 13) et rouge (>675 nm) (axe des ordonnées; HI). Le

quartile LL correspond à l'autofluorescence des cellules. Le quartile LR représente la fluorescence verte des cellules. Le quartile UR représente la fluorescence verte + rouge. Le quartile UL représente la fluorescence rouge des cellules. 20 μ L ont été analysés à 34 μ L/min.

La discrimination étant possible en milieu de culture, ce protocole a été testé sur *Gluconacetobacter liquefaciens* et *O. oeni* en vin rouge (**Fig. 6**). Cependant, en vin, aucune différence entre les deux genres bactériens n'a été mise en évidence. *Ga. liquefaciens* fluoresce comme *O. oeni*. Cela pourrait venir du fait que l'éthanol a perméabilisé la membrane de la bactérie Gram⁻ et a donc permis l'entrée du HI, rendant les deux populations fluorescentes. Le HI ne peut donc pas être utilisé pour discriminer les BA des BL dans le vin.

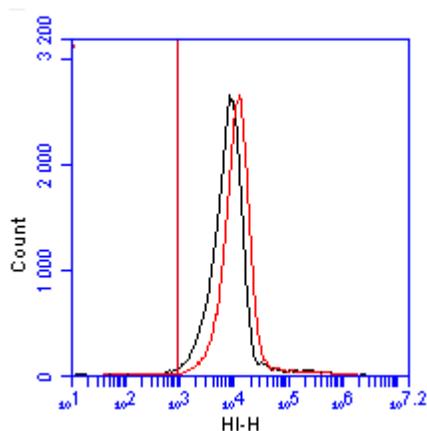


Fig. 6

Fluorescence rouge de *Ga. liquefaciens* (histogramme rouge) et *O. oeni* (histogramme noir) en vin rouge après marquage à l'iodure d'hexidium (concentration finale : 10 $\mu\text{g/mL}$) par cytométrie en flux en utilisant le filtre d'émission de fluorescence rouge ($> 675 \text{ nm}$) (axe des abscisses; HI). L'axe des ordonnées (count) représente le nombre de cellules analysées. La délimitation verticale correspond à l'autofluorescence des cellules. 20 μL ont été analysés à 34 $\mu\text{L/min}$.

1.1.2 Lectine fluorescente – CMF

Comme le fluorochrome HI ne peut être utilisé en vin, des essais ont été menés avec une lectine fluorescente. Cette dernière se fixe spécifiquement sur la paroi des bactéries Gram⁺, donc couplée à la cytométrie en flux (Holm et Jespersen, 2003), une discrimination entre les BA et *O. oeni* peut être possible.

Les premiers tests ont été effectués en milieu de culture. La **Fig. 7** présente les résultats de fluorescence verte des BA testées et de *O. oeni*.

Comme une discrimination est possible en milieu de culture, le même protocole a été mené en vin rouge. Dans ce cas, les BA présentaient une fluorescence identique à celle de *O. oeni*, donc aucune discrimination entre les BA et *O. oeni* n'a été mise en évidence (histogrammes non présentés). La principale hypothèse de cette fluorescence aspécifique est la présence de polyphénols adsorbés au niveau de la paroi des bactéries interagissant avec la lectine lors du marquage. Afin d'éliminer les possibles polyphénols adsorbés au niveau de la paroi. 5 solutions ont été testées. Le culot bactérien a été repris en NaCl 1,5 M ou en éthanol 30%, 50% ou 70% (v/v) puis incubé (voir paragraphe 1.3.1.2. du chapitre Matériels et Méthodes). Un témoin eau a été effectué. Aucune amélioration de discrimination des BA de *O. oeni* n'a été possible. C'est pourquoi, il a été décidé de continuer les expérimentations en utilisant la méthode FISH afin de permettre une discrimination des BA par rapport à *O. oeni*.

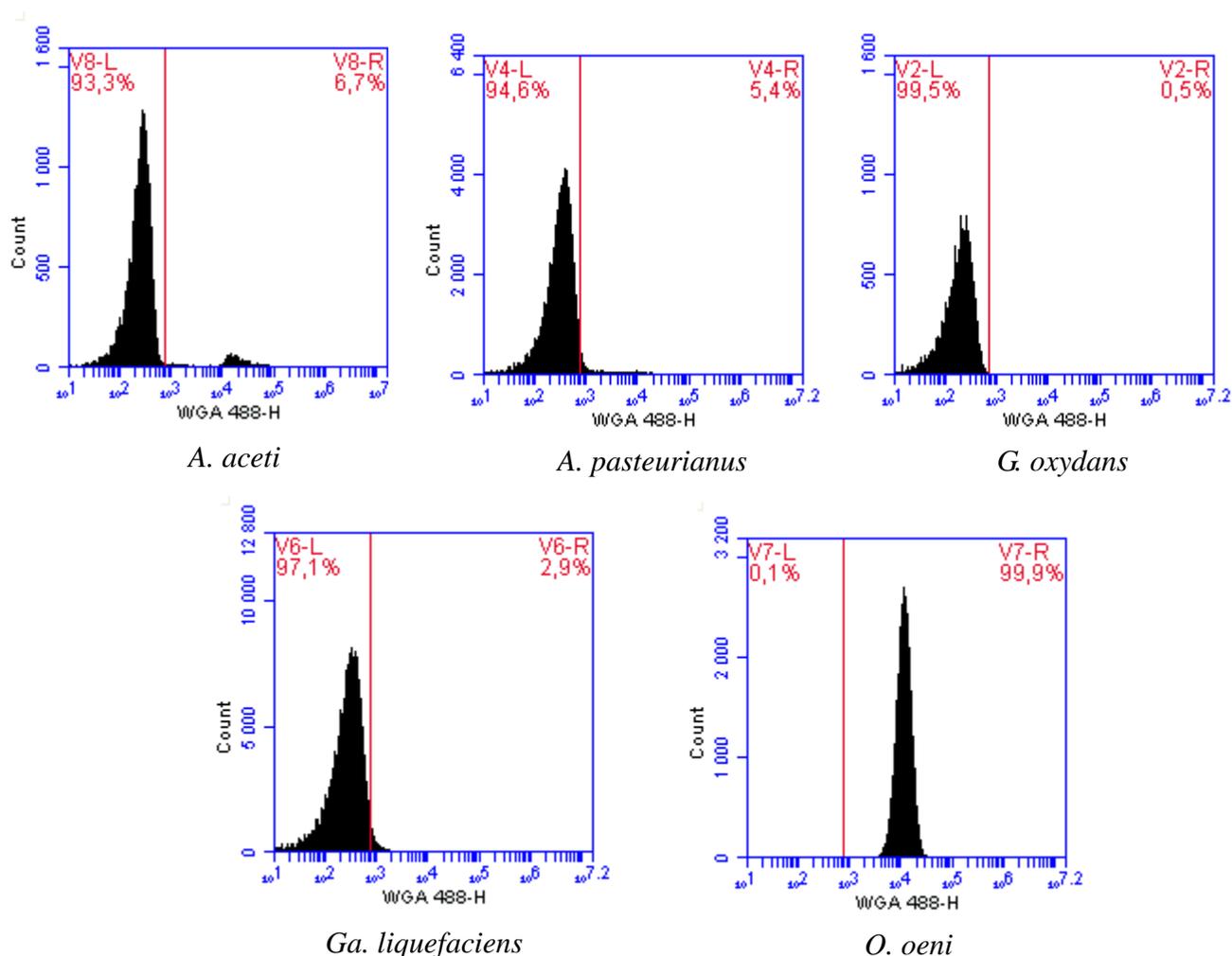


Fig. 7

Mesure de la fluorescence verte (filtre d'émission de fluorescence FL1 530 ± 15 nm, axe WGA-488) émise par les BA et *O. oeni* en milieu de culture après marquage avec la lectine couplée à l'AlexaFluor® 488 (concentration finale à 20 µg/mL). L'axe des ordonnées (count) représente le nombre de cellules analysées. La délimitation verticale correspond à l'auto fluorescence des cellules. 20 µL ont été analysés à 34 µL/min.

1.2 Sonde Aceto2 couplée au fluorochrome AlexaFluor 488

1.2.1 En milieu de culture

Des premiers essais ont été menés sur les 4 principales BA retrouvées en cas de contamination du vin, c'est-à-dire *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *G. oxydans* et *Ga. liquefaciens*. Ces tests ont été effectués en milieu de culture dans un premier temps afin de tester *in vitro* si la sonde Aceto2 retrouvée sur le site internet ProbeBase permet la discrimination des BA de *O. oeni* (témoin).

En suivant le protocole de (Wallner et al., 1993) caractérisé par une hybridation de 2 h à la température optimale de la sonde (concentration finale : 10 nM) sans perméabilisation ni fixation des cellules aux préalables, un marquage a été effectué. Après hybridation, une analyse de la fluorescence des bactéries par le cytomètre en flux a été menée (**Fig. 8**).

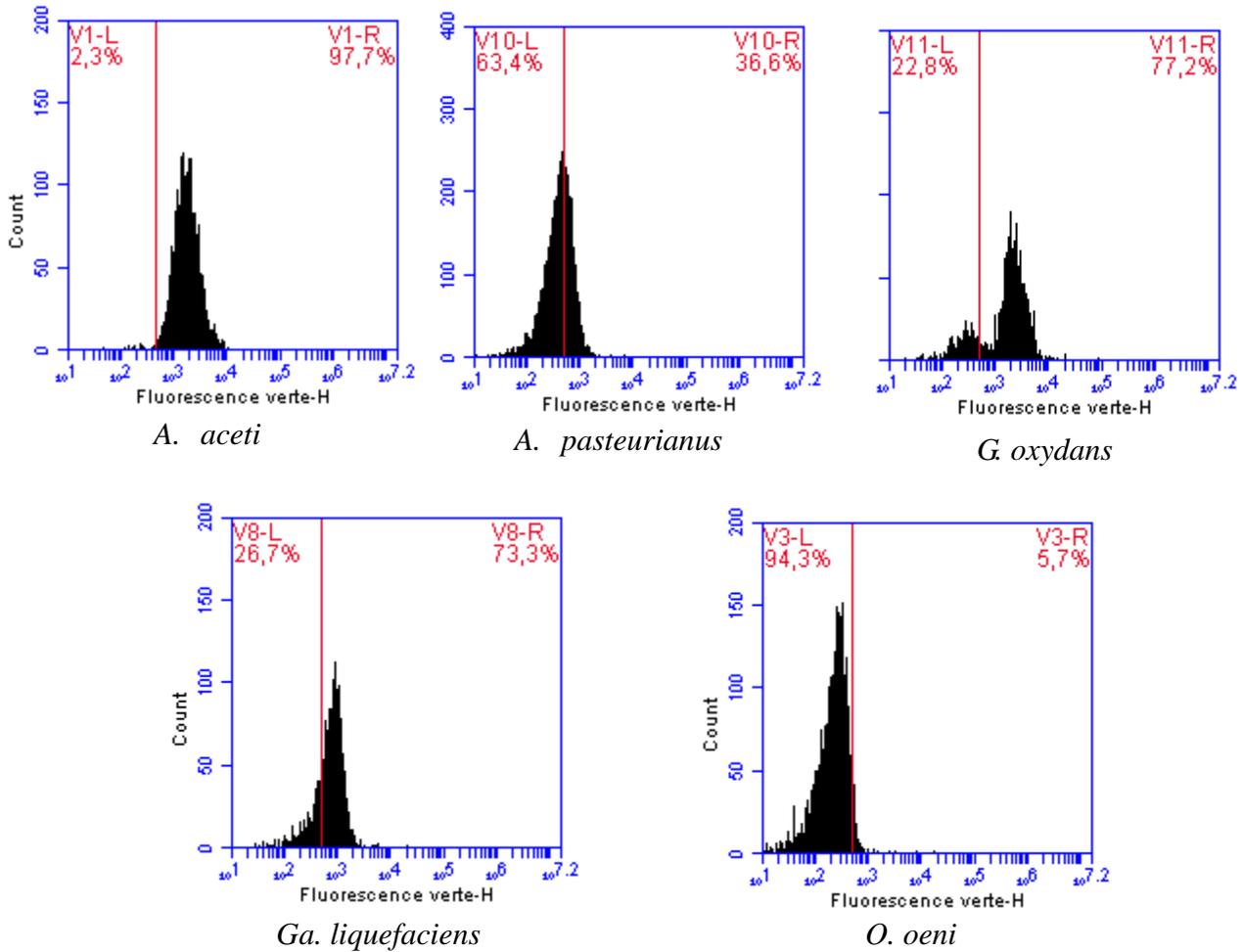


Fig. 8

Mesure de la fluorescence verte (filtre d'émission de fluorescence verte FL1 530 ± 15 nm) émise par les BA et *O. oeni* en milieu de culture après marquage avec la sonde Aceto2 couplée à l'AlexaFluor® 488 (concentration finale à 1 µM). L'axe des ordonnées (count) représente le nombre de cellules analysées. La délimitation verticale correspond à l'autofluorescence des cellules. 20 µL ont été analysés à 34 µL/min.

La meilleure discrimination est observée pour *A. aceti* puisqu'une fluorescence de plus de 97% est observée (Fig. 8). Les autres BA, *A. pasteurianus*, *G. oxydans* et *Ga. liquefaciens* présentaient des fluorescences de 37%, 77% et 73% respectivement supérieures à celle de *O. oeni*. Ces résultats indiquent donc que la sonde est capable, sous réserve d'amélioration pour certaines espèces, de discriminer les BA de *O. oeni* en milieu de culture.

1.2.2 En vin blanc

Les mêmes essais ont été menés après croissance de chaque bactérie en vin blanc. Les résultats de fluorescences sont exposés dans la Figure 9.

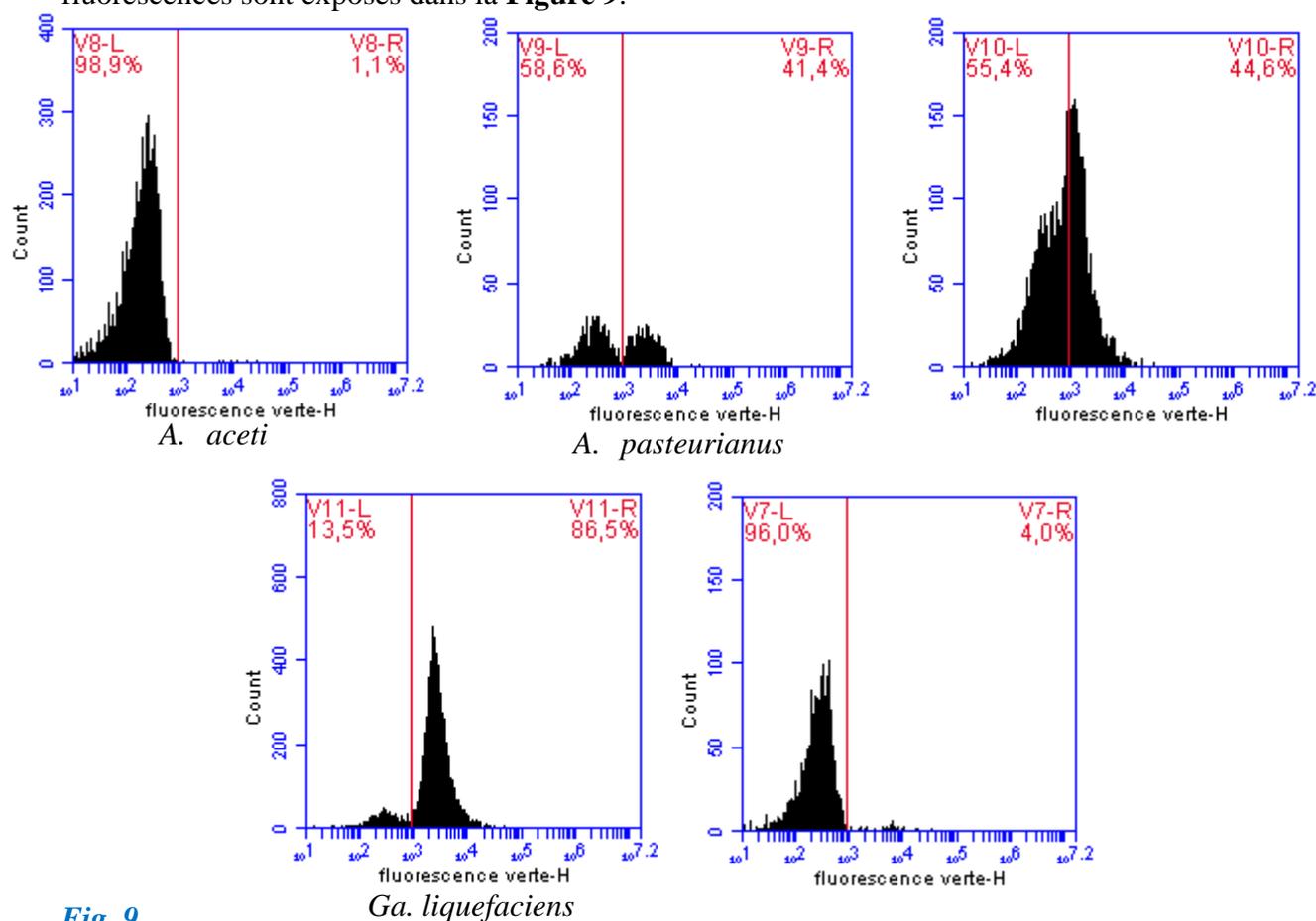


Fig. 9

Mesure de la fluorescence verte (filtre d'émission de fluorescence FL1 530 ± 15 nm) émise par les BA et *O. oeni* en vin blanc après marquage avec la sonde Aceto2 couplée à l'AlexaFluor® 488 (concentration finale à 1 µM). L'axe des ordonnées (count) représente le nombre de cellules analysées. La délimitation verticale correspond à l'autofluorescence des cellules. 20 µL ont été analysés à 34 µL/min.

Trois populations de BA présentaient une fluorescence verte. La meilleure fluorescence est pour *Ga. liquefaciens* (86,5%). D'autres expérimentations ont été effectuées afin de valider ces résultats. Cependant aucune reproductibilité entre les essais n'a pu être obtenue.

1.2.3 En vin rouge

Les mêmes essais ont été menés après croissance de chaque bactérie en vin rouge. Cependant, les BA ne présentaient aucun décalage de fluorescence par rapport à *O. oeni*. Les principales hypothèses de la non-discrimination lors de ces expérimentations ont été :

- une trop faible concentration en sonde
- une incapacité de la sonde à pénétrer à l'intérieur de la cellule
- une trop faible présence d'ARNr cible.

Afin de répondre à la 1^{ère} hypothèse, une augmentation de la concentration en sonde a été testée (concentration finale : 1 μ M au lieu de 10 nM). Une augmentation de la fluorescence a alors été constatée pour les BA et pour *O. oeni*. Un marquage non spécifique a donc lieu dans ces conditions. Afin de réduire cette aspécificité, du dextrane sulfate ou du sperme de saumon ont été ajoutés au tampon d'hybridation. Cependant, aucune amélioration n'a été constatée.

Donc la concentration en sonde à 10 nM a été retenue afin de continuer les expérimentations. Pour répondre à la seconde hypothèse, une optimisation de l'entrée de la sonde à l'intérieur de la cellule a été testée. Pour cela, deux protocoles ont été menés via l'hexaméthaphosphate de sodium et le PVPP. Ces deux techniques permettent respectivement de perméabiliser les cellules ou d'adsorber les composés phénoliques du vin pouvant inhiber l'entrée ou interagir avec la sonde fluorescente. Aucune amélioration n'a eu lieu avec l'utilisation de ces deux produits chimiques.

Suite à ces résultats, nous avons travaillé sur la 3^{ème} hypothèse. Pour cela, une sonde couplée à une enzyme a été expérimentée comme décrit ci-dessous.

1.3 Sonde Aceto2 couplée à l'enzyme HRP

Afin de pouvoir discriminer les BA de *O. oeni* en vin, il a été décidé d'utiliser la même séquence oligonucléotidique que précédemment mais cette fois-ci couplée à une enzyme HRP. L'utilisation

de cette sonde permet d'amplifier le signal de fluorescence (voir Revue paragraphe 3. du chapitre synthèse bibliographique). Après hybridation, l'utilisation de tyramide conjuguée au fluorochrome AlexaFluor® 488 permet une accumulation de fluorescence à l'intérieur de la cellule conduisant à une meilleure discrimination entre les microorganismes.

1.3.1 En milieu de culture

Pour les tests, seule *A. aceti* a été utilisée comme BA. En milieu de culture, une bonne discrimination entre les bactéries acétiques et lactiques (*A. aceti* / *O. oeni*) a été mise en évidence (Fig. 10).

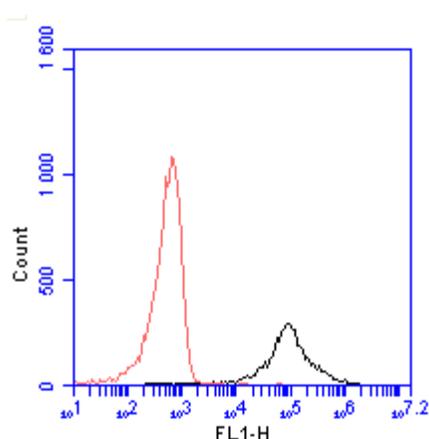


Fig. 10

Mesure de la fluorescence verte (filtre FL1 530 ± 15 nm du cytomètre en flux) émise par *O. oeni* (histogramme rouge) et par *A. aceti* (histogramme noir) en milieu de culture après 2 h d'incubation à 35°C avec la sonde Aceto2 couplée à l'enzyme HRP (concentration finale 180 nM). L'incubation avec la TSA conjuguée à l'AlexaFluor® 488 (dilution 1/50 en tampon d'amplification) est réalisée durant 30 min à 45°C.

1.3.2 En vin rouge

Le protocole de Wallner et al. (1993) a été essayé en vin rouge mais n'a pas fonctionné, celui-ci ne comporte pas d'étapes de perméabilisation et de fixation des cellules. Ces deux étapes ont donc été mises en place afin d'observer si elles permettaient de faciliter et d'améliorer l'hybridation de la sonde.

En ce qui concerne l'étape de fixation des cellules, la solution contenant du paraformaldéhyde 4% a été testée. Cette étape n'améliorerait pas les résultats finaux.

Concernant l'étape de perméabilisation des cellules avec une solution de PBS/Triton ou une solution de 50% EtOH + 50% PBS, cela n'influe pas sur les résultats de manière positive. Cependant, la solution contenant du lysozyme, EDTA et Tris-HCl a donné de meilleurs résultats. C'est donc cette solution qui a été sélectionnée pour la suite des manipulations. Cependant il a été observé que le temps d'incubation n'influe pas, puisqu'après 24 h d'incubation, il n'a pas été observé de meilleure discrimination.

Ensuite, une optimisation de l'étape d'hybridation avec la sonde a été menée. Le tampon de base était : 0,9 M de NaCl ; 20 mM de Tris-HCl et 0,1% de SDS. À ce tampon a été ajouté : soit 10% de dextrane sulfate soit 0,5 mg/mL d'ADN de sperme de saumon, afin d'améliorer le rendement d'hybridation ou de bloquer les sites aspécifiques sur la membrane où la sonde pourrait se fixer. Cependant, ces deux ajouts n'ont pas apporté d'amélioration au marquage des BA.

Puis, différentes concentrations finales en sonde ont été testées : 180 nM, 18 nM et 1,8 nM. Il a été observé que la concentration en sonde n'avait pas d'influence sur la discrimination. Les manipulations ont donc été réalisées avec une concentration initiale en sonde à 18 μ M afin de favoriser l'hybridation.

Comme les premiers essais présentaient une fluorescence des BA identique à celle de *O. oeni* avec une concentration en tyramide conjuguée à l'AlexaFluor® 488 au 1/50^{ème}, alors cette concentration en substrat a été augmentée passant de 1/50^{ème} à 1/10^{ème} (Pernthaler et al., 2002).

Pour récapituler, le protocole optimisé comporte :

- une perméabilisation durant 40 min à 37°C en tampon lysozyme (1 mg/mL), Tris-HCl (100 mM) et de EDTA (50 mM) à pH 8
- une hybridation avec la sonde spécifique des BA à 180 nM durant 2 h à 35°C en tampon d'hybridation (0,9 M de NaCl ; 20 mM de Tris-HCl ; 0,1% de SDS)
- un lavage durant 30 min à 55°C en tampon de lavage (100 mM de Tris-HCl ; 150 mM de NaCl)
- une incubation en tampon TNT (100 mM de Tris-HCl ; 150 mM de NaCl ; 0,05% (v/v) de Tween 20, pH 5) de la tyramide couplée à l'AlexaFluor® 488 (1/10^e) durant 30 min à 45°C

- un lavage en tampon (100 mM de Tris-HCl ; 150 mM de NaCl)
- un passage des échantillons au cytomètre en flux.
-

Les résultats sont présentés dans la **Fig. 11**. Il est observé une discrimination d'*A. aceti* puisqu'il y a un décalage de la fluorescence par rapport à *O. oeni* d'environ 65%. Une discrimination et une quantification de la bactérie acétique *A. aceti* a donc été obtenue grâce à ce protocole et directement en vin rouge indiquant une hybridation spécifique de la sonde sur les BA.

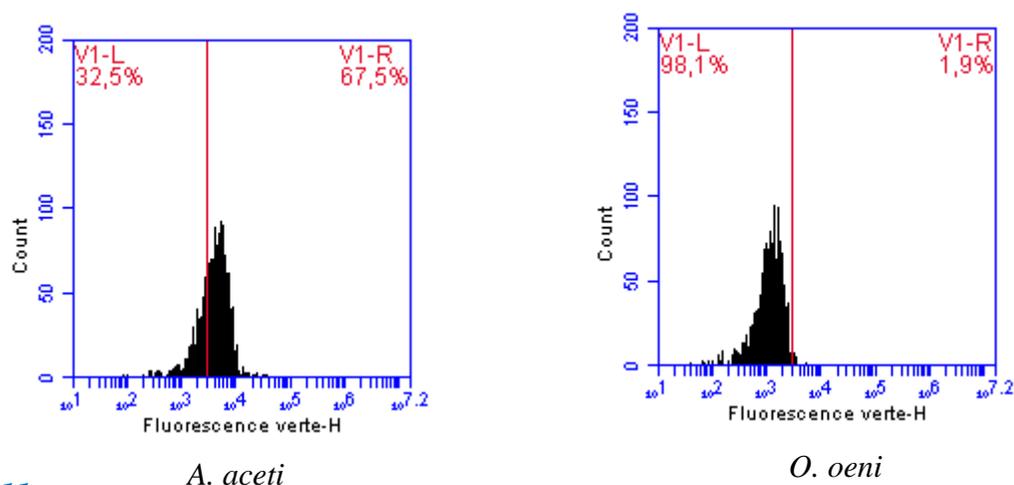


Fig. 11

Mesure de la fluorescence verte (FL1 530 ± 15 nm) émise par *A. aceti* et *O. oeni* en vin rouge après 2 h d'incubation à 35°C avec la sonde couplée à l'enzyme HRP (concentration finale 180 nM). L'incubation avec la TSA conjuguée à l'AlexaFluor® 488 (dilué au 1/10 en tampon d'amplification) est réalisée durant 30 min à 45°C. L'axe des ordonnées (count) représente le nombre de cellules analysées. La délimitation verticale correspond à l'autofluorescence des cellules.

La discrimination des BA par rapport à *O. oeni* étant positive, ce protocole a fait l'objet de tests de validations. Malgré de nombreux essais, aucun n'a permis une nouvelle discrimination entre les deux bactéries. Cela met donc en évidence un problème de répétabilité de la méthode pouvant être due à de nombreux facteurs tels que la matrice vin rouge, la durée de présence des bactéries acétiques dans le vin mais également l'état physiologique des bactéries.

Toujours dans l'optique de discriminer les deux genres bactériens, une autre température d'hybridation a été testée (57°C) afin de favoriser une hybridation spécifique de la sonde. Cette température est l'optimum de la sonde Aceto2 déterminée précédemment. La durée de l'incubation avec la sonde est toujours de 2 h. Après hybridation, la tyramide conjuguée à l'AlexaFluor® 488 a été ajoutée au mélange. Sur tous les essais menés, seulement une expérimentation a permis une discrimination entre les deux bactéries avec une différence de fluorescence de 57%.

Malgré les nombreux essais menés afin de développer un protocole permettant de discriminer les BA de *O. oeni* par CMF, il est relativement difficile d'obtenir un protocole répétable en vin rouge. Les difficultés rencontrées lors de la mise en place de ces protocoles sont principalement la petite taille des bactéries et la présence de composés du vin, principalement les polyphénols adsorbés au niveau de la paroi bactérienne, pouvant interagir avec les différents marqueurs utilisés ou avec la sonde. Les solutions de désorption des composés fixés sur la paroi testées dans cette partie ne se sont pas révélées efficaces. De plus, dans certains vins rouges, la précipitation de certains composés du vin entraîne un bruit de fond interférant avec le signal des bactéries lors de leur passage au cytomètre en flux.

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés par la suite au développement d'une méthode de quantification des BA en vin rouge par PCR en temps réel. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication dans *Frontiers in Microbiology* en juin 2016 présentée dans le paragraphe suivant.

2 Par PCR en temps réel (qPCR)



Design and Performance Testing of a DNA Extraction Assay for Sensitive and Reliable Quantification of Acetic Acid Bacteria Directly in Red Wine Using Real Time PCR

Cédric Longin*, Michèle Guilloux-Benatier and Hervé Alexandre

Equipe VAIMIS (Vin, Aliment, Microbiologie, Stress), Institut Universitaire de la Vigne et du Vin Jules Guyot, UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, AgroSup Dijon – Université de Bourgogne, Dijon, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Rosanna Tofalo,
University of Teramo, Italy

Reviewed by:

Luca Settanni,
Università degli Studi di Palermo, Italy
Rolf Dieter Joerges,
University of Delaware, USA

*Correspondence:

Cédric Longin
cedric.longin@u-bourgogne.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Food Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 16 March 2016

Accepted: 17 May 2016

Published: 01 June 2016

Citation:

Longin C, Guilloux-Benatier M and
Alexandre H (2016) Design and
Performance Testing of a DNA
Extraction Assay for Sensitive and
Reliable Quantification of Acetic Acid
Bacteria Directly in Red Wine Using
Real Time PCR.
Front. Microbiol. 7:831.
doi: 10.3389/fmicb.2016.00831

Although strategies exist to prevent AAB contamination, the increased interest for wines with low sulfite addition leads to greater AAB spoilage. Hence, there is a real need for a rapid, specific, sensitive, and reliable method for detecting these spoilage bacteria. All these requirements are met by real time Polymerase Chain Reaction (or quantitative PCR; qPCR). Here, we compare existing methods of isolating DNA and their adaptation to a red wine matrix. Two different protocols for isolating DNA and three PCR mix compositions were tested to select the best method. The addition of insoluble polyvinylpyrrolidone (PVPP) at 1% (v/v) during DNA extraction using a protocol succeeded in eliminating PCR inhibitors from red wine. We developed a bacterial internal control which was efficient in avoiding false negative results due to decreases in the efficiency of DNA isolation and/or amplification. The specificity, linearity, repeatability, and reproducibility of the method were evaluated. A standard curve was established for the enumeration of AAB inoculated into red wines. The limit of quantification in red wine was 3.7 log AAB/mL and about 2.8 log AAB/mL when the volume of the samples was increased from 1 to 10 mL. Thus, the DNA extraction method developed in this paper allows sensitive and reliable AAB quantification without underestimation thanks to the presence of an internal control. Moreover, monitoring of both the AAB population and the amount of acetic acid in ethanol medium and red wine highlighted that a minimum about 6.0 log cells/mL of AAB is needed to significantly increase the production of acetic acid leading to spoilage.

Keywords: acetic acid bacteria, red wine, microbiological internal control, DNA extraction, real time PCR

INTRODUCTION

Acetic Acid Bacteria (AAB) species typically associated with grapes and must is *Gluconobacter oxydans* (*G. oxydans*) which prefers a sugar rich environment (Joyeux et al., 1984; Bartowsky and Henschke, 2008). AAB associated with wine are *Acetobacter aceti* (*A. aceti*) and *Acetobacter pasteurianus* (*A. pasteurianus*) which prefer ethanol as a carbon source, as does *Gluconacetobacter liquefaciens* (*Ga. liquefaciens*) (Joyeux et al., 1984; Drysdale and Fleet, 1985; Yamada et al., 1997). When these AAB are present during winemaking, aging or wine storage, they metabolize

ethanol to acetaldehyde by alcohol dehydrogenase and then produce acetic acid by acetaldehyde dehydrogenase. Acetic acid is the main constituent of wine volatile acidity (Bartowsky and Henschke, 2008) and considered to be undesirable in dry wine at concentrations exceeding 0.4–0.5 g/L depending on wine type (Davis et al., 1985; Eglinton and Henschke, 1999a,b). The European regulation (CE 1308/2013) has set out limits for sale at 1.20 and 1.08 g/L acetic acid for red wines and white/rosé wines, respectively. Taking into account the ability of AAB to convert ethanol into acetic acid, these bacteria are considered as spoilage bacteria in the wine industry. Plate counting is typically used in order to quantify AAB in wine. However, culturing and enumerating AAB is challenging despite the availability of various growth media. Many studies have reported that plate counting is not appropriate for estimating AAB populations in stressful environments like wine (Sievers et al., 1992; Sokollek et al., 1998; Millet and Lonvaud-Funel, 2000; Bartowsky et al., 2003; Trcek, 2005). Indeed, this technique often underestimates AAB populations (Bartowsky and Henschke, 2008). According to Millet and Lonvaud-Funel (2000), the difficulties of isolating AAB may be due in part to the existence of a Viable But Non Culturable (VBNC) state which may result from anaerobic conditions in wine (Du Toit et al., 2005). Many techniques can be used for AAB detection like nested PCR (González et al., 2006), AAB gene (*adhA*) PCR (Trcek, 2005), PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (Ruiz et al., 2000), and many others, however, all these techniques are culture dependent and the VBNC state may lead to underestimating the AAB population. Independent culture quantification techniques using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (De Vero et al., 2006), Temperature Gradient Gel Electrophoresis (Ilabaca et al., 2008), or epifluorescence have been reported (Mesa et al., 2003; Baena-Ruano et al., 2006). These latter authors quantified AAB in vinegar fermentation using viability (i.e., measurement of cell membrane permeability) and vitality (i.e., measurement of cell enzymatic activity) dyes. This technique has a high detection limit and appreciation of fluorescence is operator dependent. Thus, qPCR techniques have been developed (Torija et al., 2010; Valera et al., 2013) to quantify AAB. The qPCR method presented by González et al. (2006) did not use any internal control and was validated with red wine inoculated with a known amount of AAB, but without any growth. However, AAB growth in wine modifies DNA extraction efficiency and qPCR reliability since polyphenols seem to be adsorbed onto the cell walls (Morata et al., 2004). In addition, problems often arise with DNA amplification due to inhibitory substances such as tannins, polysaccharides and pigments (Rossen et al., 1992; Wilson, 1997). Therefore, poor DNA isolation and/or amplification efficiency, leading to false-negative results, were observed (Tessonnière et al., 2009). The specific species quantification of AAB using TaqMan probes was also reported (Torija et al., 2010; Valera et al., 2013). However, these probes are expensive and could not be used for routine laboratory analysis to determine total AAB population. Furthermore, none of these assays used internal controls to screen for the presence of inhibitors contained in the samples, leading to unreliable quantification. The goal of the current work was to develop a qPCR technique using an internal control that

provides efficient and reliable quantification of the AAB naturally present in red wine. Different DNA extraction protocols were compared in order to remove wine inhibitors and assess the sensitivity, specificity, and reproducibility of the method.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism Strains

Four different species of AAB were used: *Acetobacter aceti* DSM 3508 (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany), *Acetobacter pasteurianus* CECT 7582 (Colección española de cultivos tipo, Universitat de València, Edificio de Investigación, Burjassot, Spain); *Gluconobacter oxydans* DSM 7145; *Gluconacetobacter liquefaciens* CIP 103109 (Collection of Institut Pasteur, Biological Resource Center of Institut Pasteur (CRBIP), Paris, France). *Oenococcus oeni* sabo11 (a biotechnological strain isolated from a South African wine) was also used as the majority LAB present in wine. AAB were adapted to ethanol by growing them in mannitol medium supplemented with ethanol [2.5% (w/v) mannitol; 0.5% (w/v) yeast extract; 0.3% (w/v) peptone, 5% (v/v) ethanol]. *O. oeni* was adapted in FT80 medium (Cavin et al., 1988). *Escherichia coli* K12 ER2738 (available from New England Biolabs) was cultivated in LB medium (1% (w/v) peptone, 0.5% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) NaCl). Yeasts, namely *Zygosaccharomyces bailii* MUCL 27812 (Mycothèque, de l'Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium), *Candida vini* MUCL 27720, *Pichia membranifaciens* PMmb2000, *P. fermentans* PFmb2005, and *Saccharomyces cerevisiae* FERMOL-PB2023, were grown in modified YPD medium (2% (w/v) glucose; 0.5% (w/v) yeasts extract, 1% (w/v) peptone) with chloramphenicol at 0.02% (w/v) added after sterilization.

Growth Conditions

For the artificial contaminations, adapted AAB were inoculated into mannitol medium supplemented with 10% (v/v) ethanol (ethanol medium), white and red wines. Growth was ensured at 28°C. Red wine made from Pinot Noir grapes was supplied by the vineyard of the University of Burgundy [pH: 3.5; 12% (v/v) alcohol] as was white wine made from Chardonnay grapes [pH: 3.5; 12% (v/v) alcohol]. The wines were filtered through a 0.2 µm sterile membrane and dispensed into sterilized Erlenmeyer flasks.

Enumeration of Microorganisms

After AAB growth in ethanol medium and white and red wines, bacteria levels were measured by flow cytometry (FCM) in BD Accuri C6 flow cytometers with a single dye DiBAC₄(3) [Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol] (ThermoFisher Scientific, Molecular Probes™, B-438) (final concentration 6 µM) in PBS buffer 1X (Biosolve, 10X concentrate Molecular biology, 162323). This compound was excited by the flow cytometer laser at 488 nm and emitted fluorescence collected by the filter 530 ± 15 nm. This dye was used for counterstaining and circumventing potential culture dependent shortcomings such as the VBNC state of wine microorganisms (Millet and Lonvaud-Funel, 2000). Three enumeration repetitions (20 µL at 34 µL/min) were performed for each sample.

Internal Control for DNA Isolation and Amplification

Specific EC23S primers were selected to quantify *E. coli* K12 ER2738 (Forward: 5'-CATAAGCGTCGCTGCCG-3'; Reverse: 5'-AAAGAAAGCGTAATAGCTCACTGGTC-3') (Ludwig and Schleifer, 2000; Chern et al., 2011). A standard curve with these primers using the 23S rRNA gene sequences as target was obtained in LB medium at 10^7 to 10^1 cells/mL. 20 μ L of internal control at 5.10^5 *E. coli*/mL were added to each 1 mL sample prior to DNA isolation to obtain a concentration of 10^4 *E. coli*/mL in each sample.

DNA Isolation and Extraction

After AAB growth and the addition of the internal control, two DNA extraction methods were tested: the Ausubel (Ausubel et al., 1992) and Lipp methods (Lipp et al., 1999). The two methods use CTAB as Jara et al. (2008) recommend. The main differences are that the second method use chloroform to purify DNA and use a CTAB precipitation solution after cell lysis to eliminate the remaining polyphenols. Moreover, DNA was re-dissolved in 50 μ L sterile deionized water for the methods. When indicated, cells were centrifuged and the pellets were resuspended into lysis buffer supplemented with PVPP at a final concentration of 1% (w/v). Each bacterium was tested in growth medium supplemented with 10% (v/v) ethanol, and white and red wines. All the experiments were performed in triplicate and repeated three times.

AAB Real-Time PCR Amplification (qPCR)

AAB primers used to amplify the 16S rRNA gene were selected from Valera et al. (2015). The forward primer AAB-F (5'-TGAGAGGATGATCAGCCACACT-3') and the reverse primer AAB-R (5'-TCACACACGCGGCATTG-3') were synthesized by Eurogentec® (France). The PCR mixture was prepared in a total volume of 25 μ L with 100 nmol of each primer and 5 μ L DNA extract. The amplifications were done in triplicate on a CFX90 real-time PCR system (Bio-Rad) under the following conditions: 95°C for 10 min, 40 denaturation cycles at 95°C for 15 s, and 62°C for 1 min. Then a melting curve was produced to check the presence of only one amplification fragment. To test PCR amplification quality, BSA, and PVP treatments during qPCR at 400 ng/ μ L and 0.5% (w/v), respectively, were performed (Tessonnière et al., 2009). A control without treatment was also performed. The PCR cycle in which fluorescence first occurred (quantification cycle: C_q) was determined automatically using Bio-Rad CFX Manager® software after setting the regression method.

Volatile Acidity According to AAB Population

The acetic acid concentration and AAB population were monitored over time in synthetic medium containing 10% (v/v) alcohol. The amount of acetic acid was measured enzymatically using a Biosentec kit (Cat. No 021) according to the manufacturer's instructions, expressed in gram per liter. The AAB population was determined throughout their growth by plating on mannitol agar (CFU/mL). The same experiment

was also performed in red wine from the vineyard of the University of Burgundy but no inoculation was performed; the AAB contamination was natural. In this experiment, the AAB population was determined by both qPCR and FCM. FCM provided the total bacteria population count. LAB enumeration was performed in FT80 Petri dishes to avoid overestimating the AAB population determined by FCM. Moreover, 15 red wines were chosen randomly from different wine regions to analyze the AAB populations (qPCR and FCM). In addition, acetic acid concentration was determined.

RESULTS

qPCR Specificity

The specificity of the AAB primers was tested against a panel of microorganisms known to be naturally present in wine. *In silico* tests were performed on *O. oeni*, *Pediococcus* spp., *Lactobacillus* spp, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida vini*, *Pichia membranifaciens*, *P. fermentans*, and *S. cerevisiae*. AAB primers did not match with the main wine microorganisms. *In vitro* tests were performed in synthetic medium against *O. oeni* and a panel of yeasts (see above). The C_q -values were the same as the negative control for all populations of *O. oeni* and yeast, thus validating the specificity of the primers. The EC23S specific primers targeting the 23S rRNA gene from *E. coli* (internal) control did not amplify DNA of the wine microorganisms tested. *E. coli* has been chosen because this microorganism is not naturally present in wine.

Comparison of DNA Isolation Methods

DNA extraction for AAB quantification was performed after growth in ethanol medium, and white and red wines using either the Lipp or Ausubel methods with or without PVPP during cell lysis. In order to compare the DNA extraction methods, the C_q obtained from DNA extracted by both methods with or without PVPP for the three different media were compared for each bacterium.

As shown in Table 1A, for ethanol medium, the Lipp method without PVPP gave significantly better results, as shown by a lower C_q whatever the bacteria, except for *G. oxydans*, showing no significant difference in the results obtained by both methods. PVPP addition during DNA extraction using either the Lipp or Ausubel method did not improve qPCR efficiency for most of the bacteria tested. PVPP addition during extraction with the Ausubel method significantly improved C_q only for *A. aceti* and *A. pasteurianus*. Thus, the choice of DNA extraction method is essential.

For white wine (Table 1B), the effect of PVPP is species dependent, but the results confirmed that the Lipp method gave much better results.

Regarding red wines which are rich in qPCR inhibitor compounds, the Lipp method gave much better C_q compared to the Ausubel method, except for *G. oxydans*. When PVPP was added prior to DNA extraction, the C_q -values did not improve whatever the DNA extraction method, except in a few cases (Table 1C). However, when using PVPP, the Lipp method was always better than the Ausubel method, as demonstrated by the lower C_q -values. For example, in our study we obtained a C_q for

TABLE 1 | C_q results according to DNA extraction (Ausubel and Lipp methods) with (+) or without (-) PVPP for *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *G. oxydans*, and *Ga. liquefaciens* in (A) growth medium supplemented with 10% (v/v) ethanol, and (B) white, and (C) red wines.

(A)		Ethanol medium			
Methods	PVPP	<i>A. aceti</i>	<i>A. pasteurianus</i>	<i>G. oxydans</i>	<i>Ga. liquefaciens</i>
Ausubel	-	32.0 ± 0.0 ^b	30.5 ± 0.0 ^c	21.8 ± 1.8 ^a	23.0 ± 1.7 ^b
	+	22.7 ± 1.7 ^a	18.3 ± 0.8 ^b	22.4 ± 1.7 ^a	23.9 ± 0.4 ^b
Lipp	-	18.5 ± 0.6 ^a	14.0 ± 0.5 ^a	18.6 ± 1.7 ^a	20.3 ± 0.6 ^a
	+	20.4 ± 2.7 ^a	15.4 ± 0.6 ^a	18.9 ± 0.8 ^a	20.2 ± 0.6 ^a

(B)		White wine			
Methods	PVPP	<i>A. aceti</i>	<i>A. pasteurianus</i>	<i>G. oxydans</i>	<i>Ga. liquefaciens</i>
Ausubel	-	23.9 ± 1.3 ^b	21.8 ± 0.8 ^a	22.4 ± 0.3 ^c	23.1 ± 1.3 ^b
	+	23.0 ± 2.8 ^{ab}	22.2 ± 0.6 ^a	22.2 ± 1.3 ^c	21.6 ± 0.0 ^{ab}
Lipp	-	19.8 ± 0.1 ^{ab}	19.8 ± 0.6 ^a	16.8 ± 0.6 ^a	21.2 ± 0.3 ^a
	+	19.6 ± 0.8 ^a	19.3 ± 2.3 ^a	19.4 ± 0.7 ^b	20.8 ± 0.4 ^a

(C)		Red wine			
Methods	PVPP	<i>A. aceti</i>	<i>A. pasteurianus</i>	<i>G. oxydans</i>	<i>Ga. liquefaciens</i>
Ausubel	-	26.4 ± 1.9 ^b	28.4 ± 0.5 ^b	25.9 ± 1.7 ^b	26.2 ± 1.1 ^b
	+	27.8 ± 0.8 ^b	26.9 ± 0.9 ^b	26.3 ± 0.8 ^b	26.1 ± 0.3 ^b
Lipp	-	23.2 ± 0.5 ^a	12.7 ± 0.7 ^a	23.8 ± 1.0 ^{ab}	21.7 ± 0.4 ^a
	+	22.4 ± 0.4 ^a	11.2 ± 0.3 ^a	22.1 ± 0.6 ^a	21.2 ± 0.0 ^a

Values represent the C_q mean ± Standard Deviation (SD); n = 3; values followed by different letters within a column are statistically different at p < 0.05 (XLStat®).

A. aceti of 27.8 in red wine (Ausubel + PVPP). When using the Lipp method with PVPP, the C_q was equal to 22.4. Thus, using the suboptimal extraction method, C_q led to underestimating the real AAB population.

Another way to improve qPCR efficiency is to add either BSA or PVP in the qPCR mix (Jiang et al., 2005; Malorny and Hoorfar, 2005). These compounds are assumed to trap inhibitors in the reaction mix. **Figure 1** shows the results of PCR assays on *A. pasteurianus*. DNA was extracted using the Lipp extraction method with PVPP, and qPCR was run with or without either the addition of BSA or PVP in the qPCR mix compared to control. The addition of BSA or PVP in the qPCR mix did not lead to any improvement of the C_q obtained. No improvement of C_q-values was observed using these compounds and, as no difference was highlighted in red wine with the Lipp DNA extraction method between the four species, neither BSA nor PVP were added in the mix to quantify AAB using the Lipp method in red wine. However, BSA added to *A. pasteurianus* DNA using the Ausubel method with or without PVPP in red wine significantly improved C_q-values compared to control, but they were always significantly higher (less effective) than the Lipp method. The values from

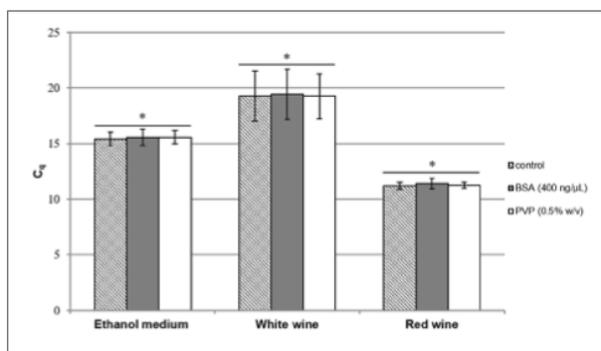


FIGURE 1 | C_q results for *A. pasteurianus* after DNA extraction by the Lipp method in mannitol supplemented with 10% (v/v) alcohol (containing 2.4.10⁶ cells/mL), white wine (containing 2.7.10⁵ cells/mL), and red wine (containing 9.9.10⁷ cells/mL). Cell lysis was performed in triplicate with PVPP and BSA (400 ng/μL) (■) or PVP (0.5% w/v) (□), added to the qPCR mix and compared to control (□). An Anova with Tukey's test was performed for each medium independently to analyze the C_q results with BSA and PVP compared to control (*p > 0.05, XLStat®). Error bars represent standard deviations.

the Ausubel DNA extraction method with or without PVPP were higher than 11.3 and 12.8 units, respectively, compared to the values obtained with the Lipp method. These results seem to indicate the presence of PCR inhibitor compounds in DNA extract using the Ausubel method with or without PVPP.

Use of *E. coli* ER2738 as Microbiological Internal Control

An *E. coli* standard curve from DNA isolation at various levels between 10¹ and 10⁷ bacteria/mL was used to evaluate qPCR efficiency (98.8%) with a correlation coefficient of 0.998. The T_m of the product had a value of 82.5 ± 0.5°C. The trend curve is: [E. coli]_{concentration} (log cells/mL) = -0.2977 × C_q + 11.581. A suspension of the strain *E. coli* K12 ER2738 was added to obtain 10⁴ cells/mL in ethanol medium (10% v/v), and white and red wines samples containing *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *G. oxydans*, and *Ga. liquefaciens*. According to the standard curve, efficient DNA extraction and amplification with EC23S primers should give a C_q-value of 25.5 ± 0.4 for 4 log cells/mL of *E. coli*. Thus, following DNA extraction performed in triplicate of each AAB in each media with both Ausubel and Lipp methods, with or without PVPP, *E. coli* was quantified.

The values in **Table 2** are the averages of *E. coli* populations found after DNA extraction according to methods with or without PVPP. No significant differences (p > 0.05) can be seen between the two techniques used for DNA extraction with or without PVPP for *E. coli* enumeration in ethanol medium and white wine. No significant cell loss was highlighted for either the Ausubel or Lipp method. However, the standard deviation of the Lipp method was lower than 0.3 log *E. coli*/mL compared to the Ausubel method for both media.

In red wine, the mean values for *E. coli* concentration in the Lipp method after DNA extraction with or without PVPP were 3.7 ± 0.2 and 3.3 ± 0.2 log cells/mL, respectively, whereas Ausubel DNA extractions led to 1.8 ± 0.2 and 1.9 ± 0.5 log

TABLE 2 | Averages of *E. coli* K12 ER2738 found after initially adding 4 log cells/mL in ethanol growth medium and white and red wines containing *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *G. oxydans*, and *Ga. liquefaciens*, and following DNA extraction.

Methods	PVPP	Ethanol medium		White wine		Red wine	
		log <i>E. coli</i> /mL	p-values	log <i>E. coli</i> /mL	p-values	log <i>E. coli</i> /mL	p-values
Ausubel	-	3.4 ± 0.7 ^a	p > 0.05	3.6 ± 0.5 ^a	p > 0.05	1.9 ± 0.5 ^b	p < 0.05
	+	3.5 ± 0.4 ^a	p > 0.05	3.7 ± 0.5 ^a	p > 0.05	1.8 ± 0.2 ^b	p < 0.05
Lipp	-	3.9 ± 0.3 ^a	p > 0.05	3.6 ± 0.1 ^a	p > 0.05	3.3 ± 0.2 ^a	p > 0.05
	+	3.6 ± 0.2 ^a	p > 0.05	3.6 ± 0.3 ^a	p > 0.05	3.7 ± 0.1 ^a	p > 0.05

The Lipp and Ausubel methods were used with (+) or without (-) PVPP during cell lysis. qPCR was done with EC23S primers. An Anova representation with Tukey's test was applied to the *E. coli* enumeration results using as control modality of 4.0 log *E. coli*/mL, (XLStat®). Values followed by different letters within a column are statistically different at p < 0.05 (XLStat®).

cells/mL, respectively, with and without PVPP. Thus, as shown in Table 2, the Lipp method with or without PVPP led to the recovery of the internal control population, which was not significantly different from the added population. Although not significant, the C_q-value following Lipp DNA extraction with PVPP tended to be slightly lower in red wine compared to experiments performed without PVPP. On the basis of these results, the Lipp DNA extraction method with PVPP was used for all extractions in wine. AAB can be quantified only if *E. coli* quantification is not significantly different from the added concentration (10⁴ *E. coli*/mL), since the detection of a loss of internal standard leads to an underestimation of AAB population.

AAB Quantification with the Presence of Other Wine Microorganisms

To verify the absence of interference by other microorganisms in naturally contaminated wine, the following procedure was implemented. AAB quantifications in red wine containing 10⁵ *A. pasteurianus*/mL alone or supplemented with *O. oeni* and *B. bruxellensis* at 10⁵ cells/ml were performed. qPCR with AAB primers was performed after validating the presence of *E. coli* at 10⁴ cells/mL. The results of the samples containing *A. pasteurianus* alone or with other microorganisms (*O. oeni* and *B. bruxellensis*) were identical: 5.1 ± 0.1 and 5.1 ± 0.2 log *A. pasteurianus*/mL, respectively.

Linearity, Repeatability, and Reproducibility in Red Wine

After artificial contamination of the red wine by AAB and incubation allowing their growth, verified over time by flow cytometry, Lipp DNA extraction with PVPP was performed in triplicate with 3 repetitive independent experiments. The T_m of the product had a value of 82.5 ± 0.5°C. AAB quantification could be done after confirming the presence of 4 log *E. coli*/mL. Efficiency, r², and y-intercept are presented in Table 3. No significant differences between efficiency, r², and y-intercept following a Tukey's test between red wines, containing each AAB species or a mix of all AAB, were observed. Thus, all the data were compiled to determine the general standard curve allowing AAB quantification in red wine whatever

TABLE 3 | Statistical analysis of qPCR parameters obtained from independent DNA isolation experiments performed on *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *G. oxydans*, and *Ga. liquefaciens* after growth in red wine in triplicate and with three repetitions of the experiment over time.

	Efficiency	r ²	y-intercept
<i>A. aceti</i>	166 ± 46 ^a	0.926 ± 0.031 ^a	35.2 ± 3.0 ^a
<i>A. pasteurianus</i>	176 ± 37 ^a	0.942 ± 0.069 ^a	33.8 ± 1.7 ^a
<i>G. oxydans</i>	167 ± 40 ^a	0.940 ± 0.018 ^a	34.4 ± 1.9 ^a
<i>Ga. liquefaciens</i>	178 ± 33 ^a	0.875 ± 0.098 ^a	33.5 ± 1.8 ^a
AAB mixture	125 ± 09 ^a	0.988 ± 0.012 ^a	33.6 ± 0.7 ^a
p values	p > 0.05	p > 0.05	p > 0.05

Three red wines containing a mix of AAB were also analyzed in triplicate. An Anova with Tukey's test were performed according to efficiency, r², and y-intercept, (XLStat®). Values followed by the same letter within a column are statistically identical at p > 0.05 (XLStat®).

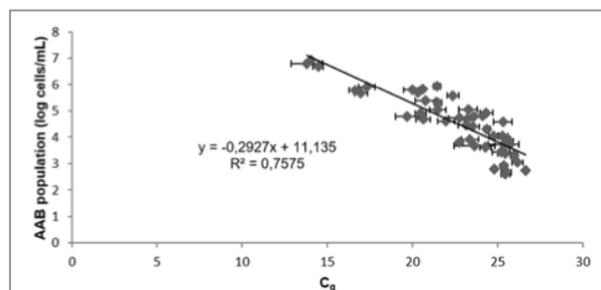


FIGURE 2 | Standard curve from 10-fold serial sample dilutions of red wines containing *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *G. oxydans*, *Ga. liquefaciens*, and the AAB mixture. The C_q values are the average of three individual experiments performed in triplicate. Error bars represent standard deviations.

the species present (Figure 2):

$$[AAB]_{\text{concentration}} (\log \text{ cells/mL}) = -0.2927 \times C_q + 11.135.$$

Limit of Quantification (LOQ) of AAB in Red Wine

For our study, LOQ was determined using the slope, residue standard deviation, and standard deviation of the intercept obtained from linearity validation experiments (OIV, 2005).

Using the Lipp method after AAB growth in red wine, the LOQ value of $5.2 \cdot 10^3$ cells/mL was obtained. These results were the mean of the three independent experiments performed in triplicate. Moreover, the sampling volume of 10 mL instead of 1 mL led to the improvement of LOQ by 0.9 ± 0.1 log cells/mL.

Acetic Acid Monitoring According to AAB Population

Acetic acid concentration monitoring was performed after *A. pasteurianus* inoculation in ethanol medium [10% (v/v)] at 10^2 cells/mL in independent experiments performed in triplicate (Figure 3). The initial amount of acetic acid was 0.04 g/L. Figure 3 shows acceptable acetic acid values of 0.04 ± 0.00 g/L for an AAB concentration from 2.2 to 5.4 log CFU/mL. The sample presented 0.52 g/L acetic acid when the *A. pasteurianus* population reached 6.9 log CFU/mL. The last analysis point has a bacterial population of 7.2 ± 0.1 log CFU/mL and shows acetic acid values from 2.39 ± 0.61 g/L. Thus, acetic acid production increased in ethanol medium and occurred when acetic acid bacteria exceeded 6 log CFU/mL. AAB growth was low between the analysis points of 10 and 14 days, indicating that culture reached a stationary phase. The high acetic acid concentration determined during this time seemed to highlight overproduction during the stationary phase of the culture, i.e., when AAB are in high concentration.

To confirm these hypotheses of acetic acid production beyond acceptable limits at a population higher than 6 log AAB/mL and during the stationary phase of AAB growth, AAB growth was monitored in red wine from the vineyard of the University of Burgundy, contaminated naturally over time (Figure 4). Both the AAB population and acetic acid concentration were determined over time. The enumeration of total bacteria in the samples was performed by FCM and LAB quantification in specific medium. Neither yeasts nor LAB were detected in the wine under study, consequently only AAB were present and enumerated. Therefore, it was possible to compare the AAB concentration determined by FCM/qPCR methods and acetic acid production. Acetic acid

concentration as a function of AAB population is presented in Figure 4. For the first points of analysis containing a population ranging from 2.9 to 6 log AAB/mL, quantifications by qPCR were well-correlated with quantification by FCM. The acetic acid concentrations at these analysis points did not exceed 0.29 g/L. Then, higher acetic acid concentrations were reached for higher acetic acid bacteria concentrations. The analysis point containing an AAB population of 6.8 ± 0.2 log bacteria/mL had 0.82 ± 0.01 g/L acetic acid. The last point of AAB growth monitoring in red wine presented a high AAB concentration with acetic acid levels exceeding the European limit values and an increase in the mean difference between the qPCR and FCM methods (1.2 ± 0.6 log cells/mL). Figure 4 validates acetic acid production by AAB during the stationary growth phase, thus when AAB exceeded 6 log bacteria/mL.

The measure of acetic acid and counting of AAB by FCM/qPCR methods were then performed on 15 red wines chosen randomly from wine regions (Figure 5). Twelve red wines had a mean amount of acetic acid at 0.52 ± 0.15 g/L. For these same samples, the median amount of acetic acid was 0.57 ± 0.15 g/L. These wines are considered as unspoiled. The mean relative difference between FCM vs. qPCR, allowing the determination of the AAB population, was 0.5 ± 0.3 log cells/mL. Three of the fifteen red wines analyzed presented a high amount of acetic acid and were thus spoiled. These wines had an AAB concentration higher than 6 log AAB/mL.

DISCUSSION

Cell quantification by qPCR in red wine is difficult since various qPCR inhibitors such as polyphenols and polysaccharides are abundant, thereby increasing the risk of false negative results (Demeke and Jenkins, 2009) and making the amplification of genetic material challenging. qPCR has been used to quantify AAB in wine (González et al., 2006; Andorrà et al., 2008; Torija et al., 2010; Valera et al., 2013), however, the authors of these

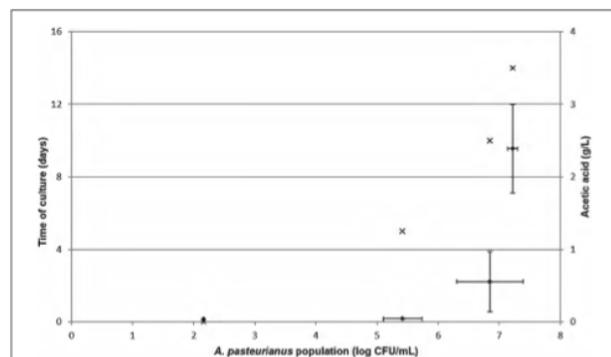


FIGURE 3 | Monitoring of *Acetobacter pasteurianus* growth in mannitol medium containing 10% (v/v) alcohol (x). Initial inoculation was 10^2 cells/mL. This experiment was performed in three independent experiments. Acetic acid concentration (♦) was determined in triplicate over time. Error bars represent standard deviations.

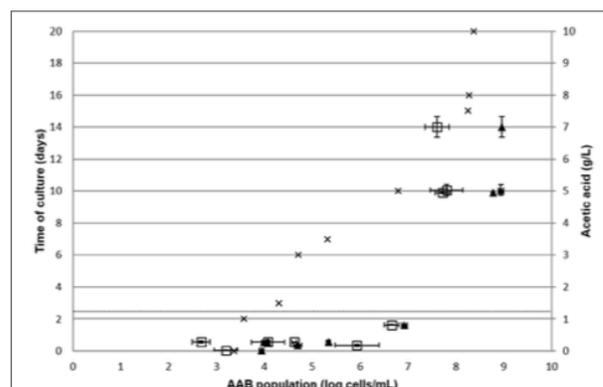
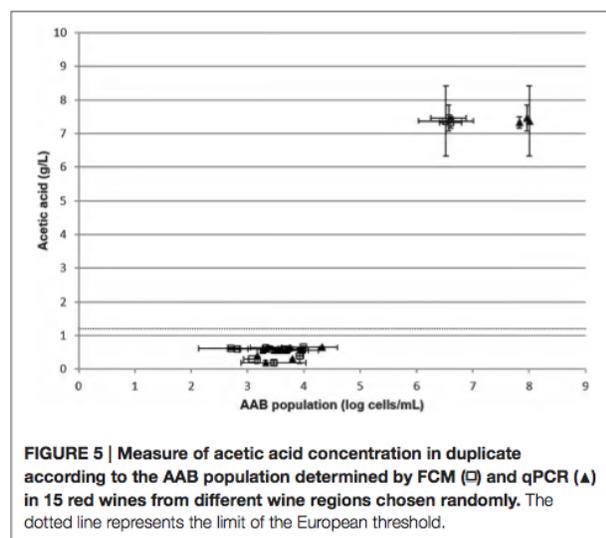


FIGURE 4 | Monitoring of natural AAB growth in red wine. The AAB population was determined by FCM (□) and qPCR (▲) in duplicate over time. Acetic acid concentration was determined in duplicated over time. The dotted line represents the limit of the European threshold. Error bars represent standard deviations.



studies did not take into account extraction efficiency or the presence of inhibitors, nor did they use any control process (cells added to the matrix). Process control can provide information on the efficiency of extraction and on the PCR procedure. The addition of a “spike” control to ensure accurate and reliable quantification is important (Fukushima et al., 2003; Stoeckel et al., 2009; van Doorn et al., 2009) and has already been reported for food analysis (Josefsen et al., 2010; Krøjgaard et al., 2011; Ishii et al., 2013), but as far as we know only once for quantifying *Brettanomyces* in wine (Tessonnière et al., 2009). In order to develop an accurate and efficient qPCR method to quantify AAB, DNA extraction procedures were first tested in order to ensure good DNA preparation. Indeed, the extraction efficiency and quality of DNA must be optimized for quantitative PCR. The selection of an appropriate DNA extraction method from those available is thus crucial (Jara et al., 2008).

DNA Extraction Method

We opted for the Lipp method (Lipp et al., 1999) since this method has proven useful for many foodstuffs, especially those rich in phenolic compounds. By comparing this method with classical CTAB extraction, we clearly demonstrated the advantage of using the former. Using our process control strain, we demonstrated that the DNA extraction method was well-suited for wine and especially red wine. Moreover, as PVPP is known to remove PCR inhibitors (Tessonnière et al., 2009) it was added in our assay and improved C_q -values. The results of our validation protocol proved the specificity of the assay. Indeed, qPCR primers showed good specificity for all the wine AAB tested and did not amplify from the other wine organisms. Moreover, our study showed that AAB population determination by qPCR with the Lipp method using PVPP was not influenced by the other microorganisms present (*O. oeni* and *B. bruxellensis*) in high concentration. Therefore, pre-amplification using a nested PCR technique (González et al., 2006) is not required to determine the AAB population in samples.

AAB qPCR Limit of Quantification

Our LOQ was 5.10^2 cells with a test sample of 10 ml. This LOQ is similar to those previously reported and was reached with AAB grown in red wines, contrary to González et al. (2006) and Torija et al. (2010). In our study, the correlation coefficient of the standard curve obtained for AAB in red wines was 0.76. This coefficient might appear low but it comes from a calibration curve used for wine. Indeed, it is essential to create calibration curves in food matrices. The creation of standard curves for the quantification of a microorganism by diluting DNA from one extraction, as has been done in most studies, should be avoided (González et al., 2006; Torija et al., 2010; Valera et al., 2013). Consequently, the influence of food matrices is not considered, resulting in an underestimation of microbial load (Cocolin and Rantsiou, 2012). Most studies have obtained a high correlation coefficient between 10-fold serial DNA dilutions, but have not performed DNA extraction from a sample containing a low bacterial population, thus biasing efficiency. DNA extraction must be performed from each dilution before running the qPCR to create a standard curve.

Evaluation of the Method with Naturally Spoiled Wines

Little is known of the spoilage caused by AAB populations and it probably depends on the matrix (sulfites, polyphenols, etc.). Also, this topic is controversial in the literature. According to Joyeux et al. (1984), a low population can activate significant volatile acidity production when exposed to air. However, Drysdale and Fleet (1985) reported that *A. pasteurianus* and *A. aceti* occur at 10^1 – 10^3 CFU/mL in many wines during bulk storage in wineries without causing spoilage. Moreover, Bartowsky and Henschke (2008) have shown that 2.10^4 *A. pasteurianus*/mL in a Shiraz wine leads to an acetic acid concentration of 0.6 ± 0.0 g/L. This wine was not considered spoiled because the initial wine, without microorganisms, contained 0.5 ± 0.0 g of acetic acid per liter. Another wine containing 9.10^4 *A. pasteurianus*/mL had 3.5 ± 1.7 g/L of acetic acid, and was thus spoiled. These results may underestimate the true population due to the uncertainty in recovering all the bacteria. In the literature, there is no clear consensus regarding AAB concentration leading to spoilage risk. Therefore, we determined the level of acetic acid concentration in ethanol medium and red wine according to the AAB population over time. In the latter, the LAB concentration was determined to avoid overestimation of the AAB population by FCM bacteria enumeration, even if the LAB is not a serious issue because AAB causes wine spoilage only during aging in the cellar and after bottling (Henick-Kling, 1993), normally without the presence of LAB. In our study, neither yeasts nor LAB were detected in these red wines. Thus, the assessment of our improved qPCR assay for AAB quantification in naturally contaminated red wine proved reliable and efficient in comparison with cytometry results. The small deviations between both methods were probably derived from the matrix, which was different to that used to write the equation. In our study, during the monitoring of AAB naturally present in red wine, red wine exhibiting an AAB population lower than 6 log bacteria/mL was not altered. However, for wines

presenting an AAB population of about 6-7 log cells/mL, the acetic acid exceeded the aroma threshold (Davis et al., 1985; Eglinton and Henschke, 1999a,b; Swiegers et al., 2005) but not the European limit values for sale. For the other wines with high AAB populations and during the stationary phase, acetic acid exceeded the European limit values. Thus, the method developed in this study had an elevated LOQ without using a higher sample volume (e.g., 10 mL).

CONCLUSION

The method allowed AAB detection and quantification before spoilage occurred, which meets the needs and expectations of the wine industry when monitoring AAB populations on a regular basis. Therefore, in our study, we developed a qPCR method which allows the reliable quantification of AAB in red wine. We showed that the previously reported DNA extraction method was not efficient enough for precise quantification. The methods used in these studies probably led to underestimating the AAB population. Use of an internal control allows validating DNA extraction and qPCR efficiencies. No underestimation can be made if the initial concentration of the internal control added in the sample before DNA extraction is found. Moreover, the standard curve was established with AAB that proliferated in red wine. Finally, as far as we know, this is the first time a qPCR protocol allowing AAB quantification in red wines without bias (neither cell loss nor PCR inhibitor presence) has been validated. Moreover, the presence of other microorganisms in the sample did not alter AAB quantification.

Specific AAB species quantification is not possible with our method; however, our main goal was to quantify AAB in wines

whatever the species present in order to evaluate the risk of spoilage. Furthermore, one drawback of the method is that qPCR quantifies live and dead AAB. Propidium monoazide could be used (Vendrame et al., 2013; Rizzotti et al., 2015) but cell exposure to a stress like ethanol, which is known to permeabilize membranes (Alexandre et al., 1994), can result in cells stained by propidium iodide, for example, but that are still alive (Davey and Hexley, 2011). Moreover, Shi et al. (2012) highlighted an underestimation of total yeasts, *S. cerevisiae*, total LAB, non-*O. oeni* LAB, and total AAB in wine by real-time PCR coupled with ethidium monoazide. However, they demonstrated that 40 min of incubation in recovery medium could completely cancel the underestimation of viable cell counts performed in wine, but not cell growth, which must be checked for each sample. To avoid this potential error, one way to circumvent the drawback of the method is to monitor the AAB population over time. Under these conditions, a decrease in C_q -value would reflect AAB growth and potentially the risk of spoilage.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: HA, CL, and MG. Performed the experiments: CL. Generated and analyzed the data: CL, HA, and MG. Wrote the paper: CL, HA, and MG.

FUNDING

This work was funded by the Regional Council of Burgundy and the Interprofessional Office of Burgundy Wines.

REFERENCES

- Alexandre, H., Rousseaux, L., and Charpentier, C. (1994). Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol. Lett.* 124, 17–22. doi: 10.1111/j.1574-6968.1994.tb07255.x
- Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J. M., and Esteve-Zarzoso, B. (2008). Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiol.* 25, 849–856. doi: 10.1016/j.fm.2008.05.005
- Ausubel, F. M., Brent, R., Robert, E., Kingston, Moore, D. D., Seidman, J. G., et al. (1992). *Short Protocols in Molecular Biology*, 2nd Edn. London: John Wiley and Sons Inc.
- Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I. M., Cantero-Moreno, D., Barja, F., and García-García, I. (2006). Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. *Process Biochem.* 41, 1160–1164. doi: 10.1016/j.procbio.2005.12.016
- Bartowsky, E. J., and Henschke, P. A. (2008). Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine—A review. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 60–70. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.016
- Bartowsky, E. J., Xia, D., Gibson, R., L., Fleet, G., H., and Henschke, P., A. (2003). Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 307–314. doi: 10.1046/j.1472-765X.2003.01314.x
- Cavin, J. F., Schmitt, P., Arias, A., Lin, J., and Divies, C. (1988). Plasmid profiles in *Leuconostoc* species. *Microbiol. Aliment Nutr.* 6, 55–62.
- Chern, E. C., Siefing, S., Paar, J., Doolittle, M., and Haugland, R. A. (2011). Comparison of quantitative PCR assays for *Escherichia coli* targeting ribosomal RNA and single copy genes. *Lett. Appl. Microbiol.* 52, 298–306. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.03001.x
- Cocolin, L., and Rantsiou, K. (2012). “Quantitative polymerase chain reaction in food microbiology,” in *Quantitative Real-Time PCR in Applied Microbiology*, Vol. 149, ed M. Filion (Norfolk: Caister Academic Press), 149–160.
- Davey, H. M., and Hexley, P. (2011). Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. *Environ. Microbiol.* 13, 163–171. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02317.x
- Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T. H., and Fleet, G. H. (1985). Practical implications of malolactic fermentation: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 290–301.
- Demeke, T., and Jenkins, G. R. (2009). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 1977–1990. doi: 10.1007/s00216-009-3150-9
- De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S., and Giudici, P. (2006). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiol.* 23, 809–813. doi: 10.1016/j.fm.2006.01.006
- Drysdale, G. S., and Fleet, G. H. (1985). Acetic acid bacteria in some Australian wines. *Food Technol. Aust.* 37, 17–20.
- Du Toit, W. J., Pretorius, I. S., and Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.* 98, 862–871. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02549.x

- Eglinton, J. M., and Henschke, P. A. (1999a). Restarting incomplete fermentations: the effect of high concentrations of acetic acid. *Aust. J. Grape Wine Res.* 5, 71–78. doi: 10.1111/j.1755-0238.1999.tb00155.x
- Eglinton, J. M., and Henschke, P. A. (1999b). The occurrence of volatile acidity in Australian wines. *Aust. N. Z. Grapegrow. Winemak.* 426a, 7–14.
- Fukushima, H., Tsunomori, Y., and Seki, R. (2003). Duplex real-time SYBR Green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5134–5146. doi: 10.1128/JCM.41.11.5134-5146.2003
- González, Á., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., and Guillamón, J. M. (2006). Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 254, 123–128. doi: 10.1111/j.1574-6968.2005.000011.x
- Henick-Kling, T. (1993). “Malolactic fermentation,” in *Wine Microbiology Biotechnology*, ed G. H. Fleet (New York, NY: Taylor & Francis Inc.), 289–326.
- Ilabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., Romero, J., and Mas, A. (2008). Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 245–249. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.001
- Ishii, S., Segawa, T., and Okabe, S. (2013). Simultaneous quantification of multiple food- and waterborne pathogens by use of microfluidic quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2891–2898. doi: 10.1128/AEM.00205-13
- Jara, C., Mateo, E., Guillamón, J. M., Torija, M. J., and Mas, A. (2008). Analysis of several methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for characterization by PCR-based methods. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 336–341. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.008
- Jiang, J., Alderisio, K. A., Singh, A., and Xiao, L. (2005). Development of procedures for direct extraction of cryptosporidium DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1135–1141. doi: 10.1128/AEM.71.3.1135-1141.2005
- Josefsen, M. H., Löfström, C., Hansen, T. B., Christensen, L. S., Olsen, J. E., and Hoorfar, J. (2010). Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5097–5104. doi: 10.1128/AEM.00411-10
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., and Ribéreau-Gayon, P. (1984). Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 153–156.
- Krøjgaard, L. H., Krogfelt, K. A., Albrechtsen, H.-J., and Uldum, S. A. (2011). Detection of *Legionella* by quantitative-polymerase chain reaction (qPCR) for monitoring and risk assessment. *BMC Microbiol.* 11:254. doi: 10.1186/1471-2180-11-254
- Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J., and Anklam, E. (1999). IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *J. AOAC Int.* 82, 923–928.
- Ludwig, W., and Schleifer, K. H. (2000). How quantitative is quantitative PCR with respect to cell counts? *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 556–562. doi: 10.1016/S0723-2020(00)80030-2
- Malorny, B., and Hoorfar, J. (2005). Toward standardization of diagnostic PCR testing of fecal samples: lessons from the detection of *Salmonellae* in pigs. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3033–3037. doi: 10.1128/JCM.43.7.3033-3037.2005
- Mesa, M. M., Macías, M., Cantero, D., and Barja, F. (2003). Use of the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of viable and total acetic acid bacteria from vinegar fermentation. *J. Fluoresc.* 13, 261–265. doi: 10.1023/A:1025094017265
- Millet, V., and Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 136–141. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00684.x
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Colomo, B., and Suárez, J. A. (2004). Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. *Eur. Food Res. Technol.* 220, 341–346. doi: 10.1007/s00217-004-1053-8
- OIV, (2005). *Practical Guide for the Validation, Quality Control, and Uncertainty Assessment of an Alternative Oenological Analysis Method*. Int. Off. Wine OIV. Available online at: <http://www.oiv.int/>
- Rizzotti, L., Levay, N., Fracchetti, F., Felis, G. E., and Torriani, S. (2015). Effect of UV-C treatment on the microbial population of white and red wines, as revealed by conventional plating and PMA-qPCR methods. *Food Control* 47, 407–412. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.07.052
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., and Rasmussen, O. F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17, 37–45. doi: 10.1016/0168-1605(92)90017-W
- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., and Guillamón, J. M. (2000). Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1981–1987. doi: 10.1099/00207713-50-6-1981
- Shi, H., Xu, W., Trinh, Q., Luo, Y., Liang, Z., Li, Y., et al. (2012). Establishment of a viable cell detection system for microorganisms in wine based on ethidium monoazide and quantitative PCR. *Food Control* 27, 81–86. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.02.035
- Sievers, M., Sellmer, S., and Teuber, M. (1992). *Acetobacter europaeus* sp. nov. a main component of industrial vinegar fermenters in central Europe. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 386–392. doi: 10.1016/S0723-2020(11)80212-2
- Sokollek, S. J., Hertel, C., and Hammes, W. P. (1998). Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *J. Biotechnol.* 60, 195–206. doi: 10.1016/S0168-1656(98)00014-5
- Stoeckel, D. M., Stelzer, E. A., and Dick, L. K. (2009). Evaluation of two spike-and-recovery controls for assessment of extraction efficiency in microbial source tracking studies. *Water Res.* 43, 4820–4827. doi: 10.1016/j.watres.2009.06.028
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., and Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 139–173. doi: 10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x
- Tessonnière, H., Vidal, S., Barnavon, L., Alexandre, H., and Remize, F. (2009). Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 129, 237–243. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.027
- Torija, M. J., Mateo, E., Guillamón, J. M., and Mas, A. (2010). Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan–MGB probes. *Food Microbiol.* 27, 257–265. doi: 10.1016/j.fm.2009.10.001
- Trcek, J. (2005). Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S–23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 735–745. doi: 10.1016/j.syapm.2005.05.001
- Valera, M. J., Torija, M. J., Mas, A., and Mateo, E. (2013). *Acetobacter malorum* and *Acetobacter cerevisiae* identification and quantification by Real-Time PCR with TaqMan–MGB probes. *Food Microbiol.* 36, 30–39. doi: 10.1016/j.fm.2013.03.008
- Valera, M. J., Torija, M. J., Mas, A., and Mateo, E. (2015). Acetic acid bacteria from biofilm of strawberry vinegar visualized by microscopy and detected by complementing culture-dependent and culture-independent techniques. *Food Microbiol.* 46, 452–462. doi: 10.1016/j.fm.2014.09.006
- van Doorn, R., Klerks, M. M., Gent-Pelzer, M. P. E., van, Speksnijder, A. G. C. L., Kowalchuk, G. A., and Schoen, C. D. (2009). Accurate quantification of microorganisms in PCR-inhibiting environmental DNA extracts by a novel internal amplification control approach using biotrope openarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7253–7260. doi: 10.1128/AEM.00796-09
- Vendrame, M., Iacumin, L., Manzano, M., and Comi, G. (2013). Use of propidium monoazide for the enumeration of viable *Oenococcus oeni* in must and wine by quantitative PCR. *Food Microbiol.* 35, 49–57. doi: 10.1016/j.fm.2013.02.007
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741.
- Yamada, Y., Hoshino, K., and Ishikawa, T. (1997). The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1244–1251. doi: 10.1271/bbb.61.1244

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Longin, Guilloux-Benatier and Alexandre. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3 Résultats complémentaires

Avant de mettre en place les expérimentations en vin rouge, des tests avaient été menés sur les mêmes BA mais en milieu de culture. Après validation de l'extraction et de la quantification par quantification du témoin interne *E. coli* ($3,6 \pm 0,1$ log cellules/mL), une quantification des BA a pu être effectuée. Le **tableau 4** montre l'efficacité, les r^2 et l'interception en y de chacune des bactéries testées.

Tableau 4

Paramètres issus d'une gamme étalon réalisée en triplicat en milieu de culture de chacune des bactéries : A. aceti, A. pasteurianus, G. oxydans et Ga. liquefaciens.

	Efficacité	r^2	y-interception
<i>A. aceti</i>	106	0,999	33,7
<i>A. pasteurianus</i>	140	0,981	36,9
<i>G. oxydans</i>	112	0,997	33,2
<i>Ga. liquefaciens</i>	114	0,993	34,6

Ces résultats aboutissent à une limite de quantification d'environ 30 cellules/mL. Une différence entre la LOQ en vin rouge explicitée dans l'article ($5,3 \cdot 10^3$ cellules/mL) et la LOQ en milieu de culture est donc mise en évidence.

La principale hypothèse pouvant expliquer cette différence est que l'ADN des cellules, qui se sont développées dans le vin rouge, est extrait moins efficacement. Le témoin interne utilisé dans ces essais ne peut mettre en évidence cette différence puisqu'il valide qu'il n'y a aucune perte au cours de l'extraction et aucune inhibition de PCR. Cependant, si l'efficacité d'extraction entre les cellules en vin rouge et les cellules en milieu de culture est différente, cela ne peut pas être mis en évidence par ce témoin interne.

Chapitre 4

*Quantification de
Brettanomyces bruxellensis
en vin rouge*

Une étude interlaboratoires, GNBrett, portée par Inter-Rhône à Orange et financée en partie par FranceAgriMer, a été montée afin que le groupe national de travail augmente les connaissances actuelles sur *B. bruxellensis*, levure d'altération dans le vin, d'un point de vue génétique, physiologique mais également sur la résistance et l'adaptation de cette levure au stress SO₂. De plus, comme *B. bruxellensis* est la principale levure d'altération retrouvée en œnologie, des quantifications précises et sensibles des populations levuriennes présentes dans les vins sont absolument nécessaires. Ainsi, un autre objectif du projet est de tester, d'améliorer et de développer de nouvelles techniques permettant une quantification rapide, sensible et précise de *B. bruxellensis* et ce directement en vin rouge.

À ce jour une technique FISH couplée à la cytométrie en flux a été précédemment développée au laboratoire afin de quantifier cette levure en matrice vinaire (Serpaggi et al., 2010). Cependant les résultats sont disponibles après 48 h environ, ce qui peut être considéré comme long par rapport à la technique de qPCR. C'est pourquoi dans le souhait d'avoir une méthode déterminant très rapidement la population présente en vin, nous nous sommes fixé l'objectif d'améliorer cette méthode afin d'obtenir des résultats plus rapidement tout en gardant une efficacité maximale.

Parallèlement, nous avons comparé des kits d'extraction et de quantification par PCR en temps réel de cette levure en matrice vin. En effet, bien que de nombreux laboratoires de recherche ou prestataires de services en œnologie utilisent ces kits, aucune étude n'a été menée afin de tester l'efficacité des kits et la répétabilité d'un ou de différents échantillons. C'est pourquoi, un axe du projet GNBrett porte sur l'étude de ces kits commerciaux appliqués à différents vins rouges artificiellement ou naturellement contaminés (vins provenant de plusieurs régions viticoles : Bordeaux, Côtes du Rhône et Bourgogne). Dans le cadre de cette comparaison, trois kits ont été retenus pour réaliser les expérimentations.

Nous présentons dans ce chapitre tout d'abord les résultats obtenus sur les différentes améliorations apportées au marquage FISH spécifique pour *B. bruxellensis* couplé à la cytométrie en flux. Ensuite, dans une seconde partie de ce chapitre les résultats issus de l'étude interlaboratoires sur les trois kits commerciaux testés sont exposés.

1 Amélioration du protocole de quantification de *B. bruxellensis* par FISH couplée la cytométrie en flux

CONFIDENTIEL

2 Comparaison inter-laboratoires de la quantification de *B. bruxellensis* en vin rouge par des kits commerciaux

Article accepté pour publication dans le journal *OENO One*

Evaluation of three *Brettanomyces* qPCR commercial kits: results from an interlaboratory study

Cédric Longin^{a*}, Frédérique Julliat^a, Virginie Serpaggi^b, Julie Maupeu^c, Geoffrey Bourbon^c, Sandrine Rousseaux^a, Michèle Guilloux-Benatier^a, Hervé Alexandre^a

^a Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France; Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Equipe VALMiS, rue Claude Ladrey, BP 27877, F-21078 Dijon, France

^b Inter-Rhône, service technique, 2260 route de grès, 84100 Orange, France

^c Microflora – Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Unité de Recherche Œnologique EA 4577, Association pour le Développement de l'Enseignement et de la Recherche en Aquitaine (ADERA), 210 chemin de Leysotte, CS 50008, 33882 Villenave d'Ornon cedex, France

*Corresponding author: cedric.longin@u-bourgogne.fr

Keywords: *Brettanomyces bruxellensis*, commercial kits, DNA extraction, quantitative PCR, red wine

Abstract

Aim: *Brettanomyces bruxellensis* is well adapted to high ethanol concentrations and low pH which allows it to develop in difficult environments, such as wine. *B. bruxellensis* is mainly found in red wine and is regarded as a spoilage yeast due to its production of ethylphenols and other compounds responsible for organoleptic defects. The detection and quantification of this yeast is essential to preventing wine spoilage. Several specific detection and quantification kits

based on real time quantitative PCR (qPCR) are commercially available. Although these kits are frequently used by private enological and research laboratories, no scientific reports on the reliability and performance of these kits, including interlaboratory and interassay comparisons, have been published. The aim of this work was to compare commercially available kits for the quantification of *B. bruxellensis* in red wine to classical method (plate counting on selective medium) in an interlaboratory study.

Methods and results: Three different commercial kits were tested on three different wines from Bordeaux, Côtes du Rhône, and Burgundy inoculated with *B. bruxellensis* at four different concentrations. Five naturally contaminated wines from different French wine regions were also tested. Our results suggest that all the kits tested probably over or underestimate the quantity of *B. bruxellensis* in red wine and, under specific conditions, give false positives.

Conclusion: Quantification may be very heterogeneous depending on the wine, laboratory, or population level. Underestimations or false negative results may have serious consequences for winemakers. Overestimation may be partly due to the quantification of dead cells by qPCR.

Significance and impact of the study: This study highlights that quantification of *B. bruxellensis* in red wine using commercial kits requires a high level of expertise in molecular biology. We recommend that all users use a microbiological internal control to validate DNA extraction yield.

Introduction

The yeast *Brettanomyces bruxellensis* is a source of wine spoilage, especially in red wines. Compounds naturally present in grape juice and wine that originate from the grapes are generally esterified (*p*-coumaric, ferulic and caffeic acids) (Dugelay et al., 1993). Enzymes with an esterase activity can release the free form of the acids (*p*-coumaric, ferulic and caffeic acids) (Gerbaux et al., 2002). These acids are decarboxylated to vinylphenols by yeast, fungi and lactic acid bacteria. *B. bruxellensis* is able to reduce these vinylphenols to ethylphenols leading to an unpleasant taste (Chatonnet et al., 1997, 1995).

The detection and quantification of this yeast is necessary to prevent wine spoilage. The isolation of yeast on Wallerstein Laboratory Nutrient (WLN)-based medium is routinely used as a simple

test in the wine industry (Rodrigues et al., 2001) as recommended by the Oenological Codex 2016 Edition. In addition, several DNA-based techniques are used to detect or quantify this yeast by culture dependent or independent methods, such as RNA-FISH (Röder et al., 2007; Serpaggi et al., 2010; Stender et al., 2001), PNA-FISH (Stender et al., 2001), ITS PCR coupled to RFLP (Esteve-Zarzoso et al., 1999), DGGE (Cocolin et al., 2004; Prakitchaiwattana et al., 2004; Renouf et al., 2006), TGGE (Hernán-Gómez et al., 2000), loop mediated isothermal amplification (Hayashi et al., 2007), and quantitative PCR (qPCR) (Delaherche et al., 2004; Phister and Mills, 2003; Tessonnière et al., 2009; Willenburg and Divol, 2012). Several specific qPCR-based quantification kits have been developed based on previous studies reporting the efficiency of qPCR to specifically quantify *B. bruxellensis* and are commercially available.

In this study, we report on the variability of three qPCR kits designed to quantify *B. bruxellensis* in red wine based on data generated from three laboratories specialized in wine analyses. Each laboratory followed the commercial protocols to generate comparable data. The laboratories used standardized protocols and the same batch of DNA isolation and amplification reagents to limit variability.

Materials & Methods

Participants

Three laboratories were selected for participation: the VAIMiS lab (Dijon, FR), the Microflora-ISVV lab (Bordeaux, FR) and the Inter-Rhône lab (Orange, FR). The names of the laboratories were randomly codified (lab 1, lab 2 and lab 3).

Conditions

Each laboratory used a different strain of *B. bruxellensis* to artificially contaminate red wine. The Inter-Rhône, Microflora, and VAIMiS labs used the strains GSLEV17, CRBO LO417 (Centre de Ressources Biologiques Oenologiques, ISVV, Villenave d'Ornon, France), and LO2E6, respectively, and red wine of each region was inoculated at four different population levels: 10^2 , 10^3 , 10^4 , and 10^5 cells/mL, referred to as levels 1, 2, 3, and 4, respectively. The cells were adapted to ethanol by growing them on YPD agar (10 g/L yeast extract, 20 g/L bacto-peptone, 20

g/L glucose, 20 g/L agar) supplemented with 5% (v/v) ethanol at 28°C for 5 days. Stationary phase cells were used to inoculate diluted red wine (50% red wine: 50% physiological saline water) and incubated for one week at 28°C. The adapted cells were then used to inoculate filter sterilized red wine from each region.

Moreover, five naturally contaminated wines from different wineries were also analyzed by the three laboratories.

Methods for the enumeration of *B. bruxellensis*

Reference method

The reference method consisted of counting *B. bruxellensis* colonies on nutritive media plates. Each sample was enumerated in Petri dishes on ITV selective medium: 10 g/L yeast extract, 20 g/L bacto-peptone, 20 g/L glucose, 0.1 g/L *p*-coumaric acid, 0.1 g/L ferulic acid, 0.03 g/L bromocresol green, 0.2 g/L chloramphenicol, 0.006% (w/v) cycloheximide, 20 g/L agar; pH adjusted to 5 (Gerbaux et al., 2000).

Alternative method

The alternative method consisted of qPCR performed with commercial kits. Three different commercial kits (arbitrarily named Kit 1, Kit 2, and Kit 3) were tested for *B. bruxellensis* DNA extraction and amplification. DNA extraction and amplification protocols were performed according to the manufacturers' instructions. Standard curves were used in two kits, whereas one kit allowed direct quantification based on the amplification of reference DNA. Each laboratory used two kits, i.e. each sample was analyzed by the same kit in triplicate by two different laboratories. PCR reactions were performed on a CFX96 real-time PCR system (Bio-Rad) for two laboratories and on an iCycler IQ5 system (Bio-Rad) for the third. Results were analyzed using Bio-Rad CFX Manager® software. The PCR cycle where fluorescence first occurred (quantification cycle: C_q) was determined automatically after setting the regression method.

Red wines from Côtes du Rhône, Burgundy, and Bordeaux were supplemented with a high level of molecular sulfite (approximately 2 mg/L mSO_2) to determine whether the kits quantify dead *B.*

bruxellensis. Cell quantifications using the three kits were performed after two weeks. The total *B. bruxellensis* population and culturable cells present in the red wines were determined by flow cytometry (FCM) or microscopy methods and plate counting, respectively. Viability was determined by FCM. Solutions containing cells used to determine total populations were stained with dyes (propidium iodide and fluorescein diacetate) according to the protocol described in the study of Salma et al. (2013).

Construction of the accuracy profiles and statistical processing

The construction of the accuracy profile was performed as described by Boubetra et al. (2011). The acceptability criterion was defined as ± 0.3 log units/mL for the alternative method in our study. Target values, based on the median values obtained using the reference method, were determined. The results were generated using the alternative method, and the reproducibility standard deviation (SD) (s_R), the limits of acceptability (λ), the proportion of β -expectation tolerance interval (β), and the difference between the level determined by qPCR and the target value (*Bias*) were determined for each inoculation concentration. The accuracy profiles were constructed using these results.

The reproducibility standard deviation (SD) (s_R) is calculated based on the SD between triplicates (s_r) and SD between labs (s_L):

$$s_R = \sqrt{s_r^2 + s_L^2}$$

A β expectation tolerance interval (β -ETI) is defined as an interval that covers an average percentage of a variable distribution. For example, a β -ETI can claim to contain 80% of future measurements, on average. A β -ETI can be expressed as:

$$\bar{x} \pm k_M \times s_r$$

where k_M is the coverage factor, given by the equation:

$$k_M = Qt\left(v, \frac{1+\beta}{2}\right) \sqrt{1 + \frac{1}{I \times J \times G^2}}$$

where s_r is the repeatability standard deviation, Qt the percentile of a Student t test distribution, β the chosen probability (80% in this study), I the number of laboratories, J the number of replicates, v the number of degrees of freedom, and G given by the equation:

$$G = \sqrt{\frac{H+1}{J \times H+1}}$$

where $H = s_L^2 / s_r^2 = s_R^2 / s_r^2 - 1$, s_R^2 is the reproducibility variance, and s_r^2 the repeatability variance. The number of degrees of freedom, v , is given by the equation:

$$v = \frac{(H-1)^2}{\frac{H+\frac{1}{J}}{I-1} + \frac{1-\frac{i}{J}}{I \times J}}$$

where i is the number of laboratories performing the analysis ($i < I$). In our study, i was equal to 2.

Results

Reference results

We calculated the reference values, also called target values, for each level of contamination from the median values obtained using the reference method (plate counting). **Table 1** shows the theoretical values (10^2 , 10^3 , 10^4 , and 10^5 cells/mL). *B. bruxellensis* populations counted by plating were very close to the expected cell population except for one wine. The Bordeaux wine had a population that was lower than the theoretical values due to the inability to obtain a high cell concentration for this *B. bruxellensis* strain in this wine and a likely decrease in viability after inoculation.

Table 1

Mean \pm standard deviation (\log_{10} CFU/mL) of culturable populations determined by plate counting on selective medium of red wines artificially contaminated at four population levels analyzed by the three laboratories, in triplicate.

		Levels(\log_{10} CFU/mL)			
Theoretical values		2	3	4	5
Values found	Burgundy wine	2.3 \pm 0.6	3.7 \pm 0.3	4.8 \pm 0.4	5.8 \pm 0.4
	Bordeaux wine	0.4 \pm 0.3	1.1 \pm 0.6	2.5 \pm 0.5	3.7 \pm 0.1
	Côtes du Rhône wine	2.6 \pm 0.6	3.4 \pm 0.9	4.5 \pm 0.6	5.4 \pm 0.6

Linearity

Linearity of the results for each wine and each kit was determined by plotting the logarithmic results obtained by plate counting (mean of the three labs) against the values determined using the qPCR commercial kits. The correlation coefficient (r^2) values are shown in **Table 2**. The mean r^2 values were 0.9558 ± 0.0471 for Kit 1, 0.8934 ± 0.0820 for Kit 2, and 0.9094 ± 0.0670 for Kit 3. With four population levels, the degree of freedom is equal to 2 for this statistical analysis. With a risk of error (α) of 10%, the critical r^2 value is 0.9. Eight of 18 results were not valid ($r^2 < 0.9$) (**Table 2**).

Table 2

r^2 values according to the kit, lab and wine analyzed at the four population levels, in triplicate.

Kits	r^2 values									Means
	Burgundy Wine			Bordeaux wine			Côtes du Rhône wine			
	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 1	Lab 2	Lab 3	
Kit 1	nd	0.9960	0.9867	nd	0.9584	0.9715	nd	0.8648	0.9574	0.9558
Kit 2	0.9560	nd	0.8684	0.9105	nd	0.7551	0.9908	nd	0.8797	0.8934
Kit 3	0.9557	0.9670	nd	0.7985	0.9655	nd	0.8723	0.8974	nd	0.9094

nd: not determined

Validation criteria and statistical results

Counts obtained using the alternative method are presented in \log_{10} units. The validation criteria and statistical results for the Côtes du Rhône, Burgundy, and Bordeaux wines are shown in **Supplementary data 1**, **Supplementary data 2** and **Supplementary data 3**, respectively.

Repeatability was calculated for each wine according to population level and kit. The mean repeatability was 0.257, 0.183, and 0.390 \log_{10} cells/mL for Kits 1, 2, and 3, respectively.

Supplementary data 1

Validation criteria and statistical results for the Côtes du Rhône wine.

Parameters	No. of \log_{10} CFU or cells/mL with a β of 80% and a λ of 0.3 at indicated contamination level ^a											
	1			2			3			4		
Levels	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 1	Kit 2	Kit 3
Target value	2.600	2.600	2.600	3.410	3.410	3.410	4.460	4.460	4.460	5.420	5.420	5.420
No. of participants (<i>l</i>)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Avg of the level (alternative)	2.711	1.321	0.766	3.892	2.391	1.715	4.950	3.425	5.336	6.196	5.283	6.395
Repeatability SD (s_r)	0.196	0.197	0.428	0.134	0.113	0.330	0.180	0.072	0.086	0.121	0.077	0.170
Between-lab SD (s_L)	0.279	0.460	1.055	0.529	0.957	2.418	0.234	0.133	0.420	0.237	0.220	0.454
Reproducibility SD (s_R)	0.341	0.500	1.138	0.546	0.963	2.440	0.295	0.151	0.429	0.266	0.234	0.484
Coverage factor (k_M)	2.766	3.359	3.400	3.621	3.736	3.726	2.599	3.128	3.672	3.202	3.490	3.453
TI SD (s_{IT})	0.402	0.602	1.372	0.664	1.178	2.982	0.346	0.180	0.523	0.318	0.283	0.585
Absolute lower TI limit	1.768	-0.359	-3.103	1.915	-1.209	-7.376	4.184	2.952	3.762	5.346	4.468	4.723
Absolute upper TI limit	3.654	3.002	4.635	5.868	5.991	10.806	5.717	3.898	6.911	7.046	6.098	8.067
Bias	0.111	-1.279	-1.834	0.482	-1.019	-1.695	0.490	-1.035	0.876	0.776	-0.137	0.975
Lower TI limit ($\beta=80\%$)	-0.832	-2.959	-5.703	-1.495	-4.619	-10.786	-0.276	-1.508	-0.698	-0.074	-0.952	-0.697
Upper TI limit ($\beta=80\%$)	1.054	0.402	2.035	2.458	2.581	7.396	1.257	-0.562	2.451	1.626	0.678	2.647
Lower acceptability limit ($-\lambda$)	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3
Upper acceptability limit ($+\lambda$)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

^a β : tolerance probability; λ : acceptability limit in \log_{10} units.

Supplementary data 2

Validation criteria and statistical results for the Burgundy wine.

Parameters	No. of log ₁₀ CFU or cells/mL with a β of 80% and a λ of 0.3 at indicated contamination level ^a											
	1			2			3			4		
Levels	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 1	Kit 2	Kit 3
Target value	2.260	2.260	2.260	3.740	3.740	3.740	4.830	4.830	4.830	5.780	5.780	5.780
No. of participants (I)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Avg of the level (alternative)	1.098	0.542	0.965	2.246	1.001	2.147	3.635	2.086	4.710	4.958	3.851	5.574
Repeatability SD (s _r)	0.147	0.291	0.190	0.262	0.223	0.716	0.154	0.194	0.251	0.680	0.202	0.119
Between-lab SD (s _L)	0.634	0.747	1.360	0.446	0.637	1.457	0.524	0.368	0.872	0.383	0.928	0.441
Reproducibility SD (s _R)	0.651	0.802	1.373	0.518	0.675	1.624	0.546	0.416	0.907	0.780	0.949	0.457
Coverage factor (k _m)	3.645	3.427	3.723	3.036	3.491	3.240	3.572	3.168	3.579	1.800	3.659	3.601
TI SD (s _{TI})	0.792	0.968	1.678	0.616	0.817	1.945	0.663	0.496	1.102	0.871	1.157	0.555
Absolute lower TI limit	-1.274	-2.206	-4.148	0.674	-1.356	-3.115	1.684	0.770	1.462	3.554	0.378	3.929
Absolute upper TI limit	3.469	3.289	6.078	3.818	3.358	7.409	5.587	3.402	7.958	6.362	7.324	7.220
Bias	-1.162	-1.718	-1.295	-1.494	-2.739	-1.593	-1.195	-2.744	-0.120	-0.822	-1.929	-0.206
Lower TI limit (β=80%)	-3.534	-4.466	-6.408	-3.066	-5.096	-6.855	-3.146	-4.060	-3.368	-2.226	-5.402	-1.851
Upper TI limit (β=80%)	1.209	1.029	3.818	0.078	-0.382	3.669	0.757	-1.428	3.128	0.582	1.544	1.440
Lower acceptability limit (-λ)	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3
Upper acceptability limit (+λ)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

^a β: tolerance probability; λ: acceptability limit in log₁₀ units.

Kit 1 underestimated the four population levels in Burgundy wine by a mean of 1.2 log₁₀ cells/mL. The population levels determined by Kit 1 for the Côtes du Rhône and Bordeaux red wines were overestimated by 0.5 and 1.1 log₁₀ cells/mL relative to the reference method.

Kit 2 underestimated all population levels in the Burgundy and Côtes du Rhône wines (bias of -2.3 and -0.9 log₁₀ cells/mL, respectively). This kit also underestimated the lowest three population levels in the Bordeaux wine, with a bias of -0.9 log₁₀ cells/mL, whereas the highest population level had a bias of approximately 0.6 log₁₀ cells/mL.

Supplementary data 3

Validation criteria and statistical results for the Bordeaux wine.

Parameters	No. of log ₁₀ CFU or cells/mL with a β of 80% and a λ of 0.3 at indicated contamination level ^a											
	1			2			3			4		
Levels	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 1	Kit 2	Kit 3
Target value	0.410	0.410	0.410	1.114	1.114	1.114	2.477	2.477	2.477	3.650	3.650	3.650
No. of participants (I)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Avg of the level (alternative)	0.988	0.662	0.974	2.283	0.944	0.829	3.561	1.575	2.300	5.059	1.986	5.315
Repeatability SD (s _r)	0.389	0.174	0.133	0.273	0.222	0.694	0.211	0.193	1.348	0.337	0.237	0.217
Between-lab SD (s _L)	0.252	0.619	1.375	0.761	0.116	0.000	1.047	0.000	0.000	1.405	0.415	0.069
Reproducibility SD (s _R)	0.464	0.643	1.381	0.808	0.250	0.694	1.068	0.193	1.348	1.445	0.478	0.228
Coverage factor (k _M)	1.851	3.587	3.747	3.478	1.779	1.625	3.675	1.625	1.625	3.636	3.073	1.675
TI SD (s _T)	0.522	0.782	1.690	0.977	0.279	0.750	1.302	0.209	1.456	1.759	0.569	0.249
Absolute lower TI limit	0.130	-1.646	-4.202	-0.528	0.499	-0.299	-0.363	1.260	0.110	-0.194	0.518	4.934
Absolute upper TI limit	1.846	2.970	6.149	5.094	1.389	1.958	7.486	1.889	4.491	10.312	3.453	5.696
Bias	0.578	0.252	0.564	1.169	-0.170	-0.284	1.084	-0.903	-0.177	1.409	-1.664	1.665
Lower TI limit (β=80%)	-0.280	-2.056	-4.612	-1.642	-0.615	-1.413	-2.840	-1.217	-2.368	-3.844	-3.132	1.284
Upper TI limit (β=80%)	1.436	2.560	5.739	3.980	0.276	0.844	5.009	-0.588	2.014	6.662	-0.197	2.046
Lower acceptability limit (-λ)	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3	-0.3
Upper acceptability limit (+λ)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

^a β: tolerance probability; λ: acceptability limit in log₁₀ units.

Kit 3 also led to an underestimation of all population levels in the Burgundy wine (mean bias of 0.8 log₁₀ cells/mL). This kit also underestimated two population levels in the Bordeaux and Côtes du Rhône wines, with a bias of -0.2 and -1.8 log₁₀ cells/mL, respectively, whereas two others were overestimated by a mean of 1.1 and 0.9 log₁₀ cells/mL.

In summary, we could not establish any relation between the population level and the reproducibility or bias.

We compared the reproducibility standard deviation (SD) and absolute bias between the kits (Table 3). All absolute values for the reproducibility SD were high (from 0.4 to 1.1 log₁₀ cells/mL). The best bias was 0.5 and the highest was 2.3 log₁₀ cells/mL. Based on these results, no kit precisely quantified *B. bruxellensis* levels in red wine because the reproducibility SD and

bias exceeded the acceptability limits. *B. bruxellensis* levels were frequently underestimated, highlighting the imprecision of this contamination measure and the risk of obtaining false negative results.

Table 3

Absolute mean standard deviations of reproducibility and bias according to the wine tested and the kit used, independent of the contamination levels.

Absolute means (log ₁₀ cells/mL)									
	Burgundy wine			Bordeaux wine			Côtes du Rhône wine		
	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 1	Kit 2	Kit 3	Kit 1	Kit 2	Kit 3
Reproducibility SD	0.624 ±	0.710 ±	1.090 ±	0.946 ±	0.391 ±	0.913 ±	0.362 ±	0.462 ±	1.123 ±
	0.119	0.226	0.516	0.415	0.208	0.556	0.127	0.366	0.935
Bias	1.168 ±	2.283 ±	0.804 ±	1.060 ±	0.747 ±	0.672 ±	0.465 ±	0.867 ±	1.345 ±
	0.275	0.537	0.750	0.350	0.843	0.898	0.273	0.501	1.555

Accuracy profiles

We generated accuracy profiles to visualize the level of imprecision in quantifying *B. bruxellensis* levels in red wine. Examples of the accuracy profiles for the Côtes du Rhône wine calculated from the results obtained using Kits 1, 2, and 3 are presented in **Fig. 1a**, **1b**, and **1c**, respectively. The acceptability limit for this study was ± 0.3 log₁₀ cells/mL. This value was the maximum acceptable limit and the performance of each kit was tested to determine whether the alternative method is at least as good as the reference method. For this wine, only two values obtained using Kit 1 (level 1) and Kit 2 (level 4) were within the acceptable limits. However, the β -ETIs were not within these limits, meaning that there is an 80% probability that future analyses will be outside these limits.

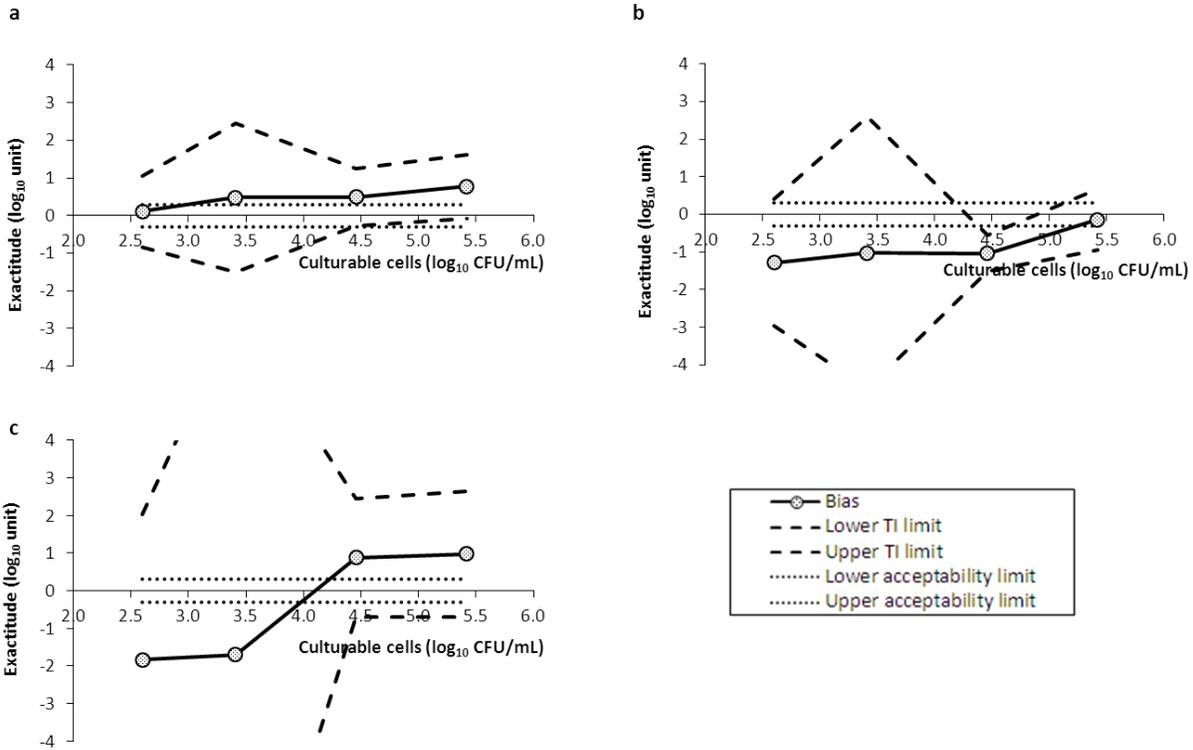
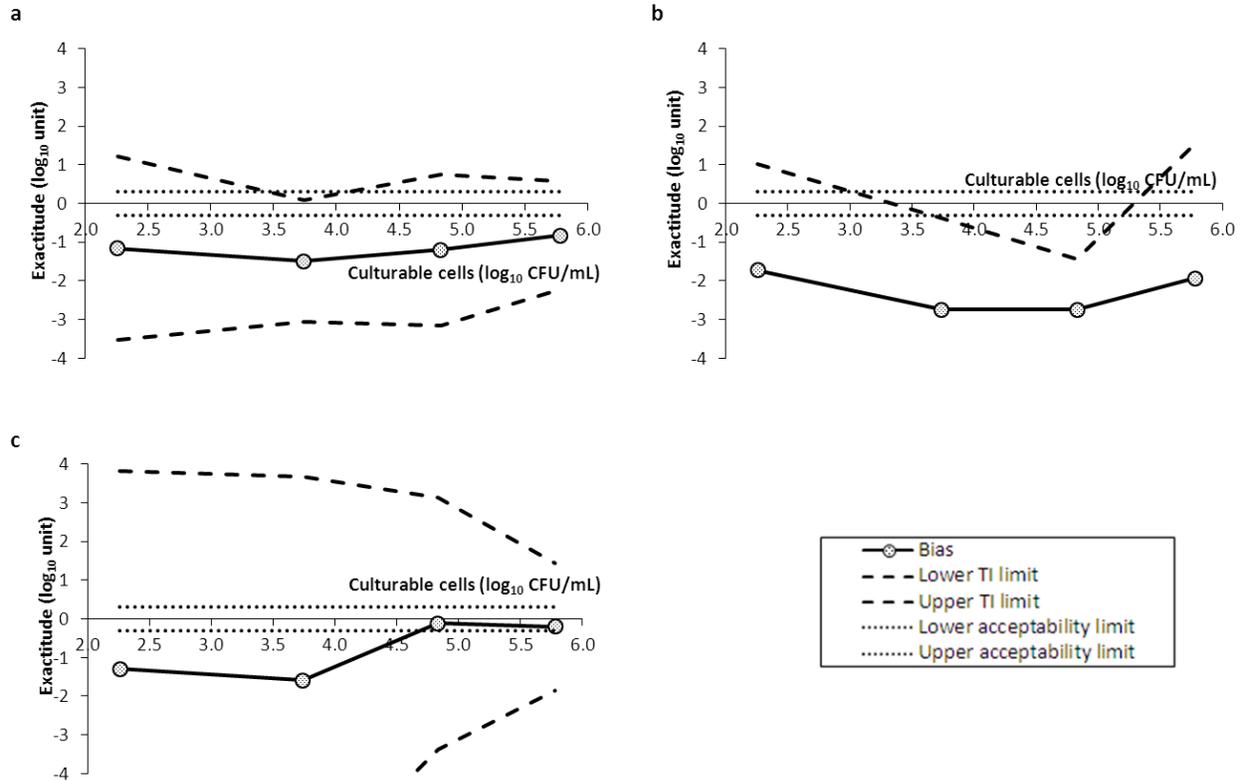


Figure 1

Accuracy profiles of the alternative method based on the results of Kit 1 (a), Kit 2 (b), and Kit 3 (c) for the Côtes du Rhône red wine with a β equal to 80% and a λ of ± 0.3 log₁₀ unit. The X axis shows the results from the reference method (log₁₀ CFU/mL) and the Y axis the differences between the reference method and the qPCR kits.

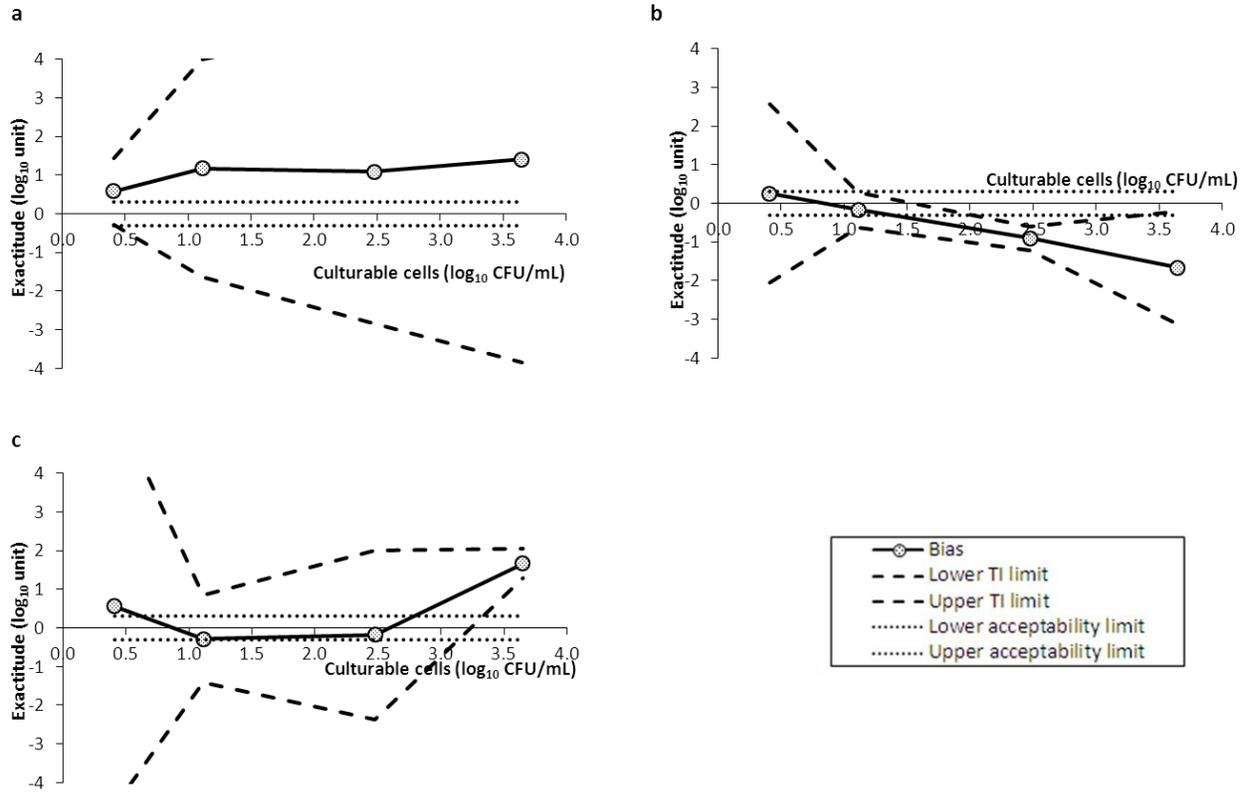
The accuracy profiles for the Burgundy red wine are presented in **Supplementary data 4**. Only two values were within the acceptable limits (levels 3 and 4 with Kit 3) but the bias (β -ETIs) was outside the acceptable limits.



Supplementary data 4

Accuracy profiles of the alternative method based on the results of Kit 1 (a), Kit 2 (b), and Kit 3 (c) for the Burgundy red wine with a β equal to 80% and a λ of ± 0.3 log₁₀ unit. The X axis shows the results from the reference method (log₁₀ CFU/mL) and the Y axis the differences between the reference method and the qPCR kits.

The accuracy profiles for the Bordeaux wine are presented in **Supplementary data 5**. Two values obtained with Kit 2 were within acceptable limits (levels 1 and 2) as were two values obtained with Kit 3 (levels 2 and 3), but, as above, the β -ETIs were not within these limits.



Supplementary data 5

Accuracy profiles of the alternative method based on the results of Kit 1 (a), Kit 2 (b), and Kit 3 (c) for the Bordeaux red wine with a β equal to 80% and a λ of ± 0.3 log₁₀ unit. The X axis shows the results from the reference method (log₁₀ CFU/mL) and the Y axis the differences between the reference method and the qPCR kits.

Analysis of dead yeast

We performed trials with the commercial kits on cells subjected to sulfite treatment to test whether overestimation of *B. bruxellensis* populations may be due to the quantification of dead yeast. The results are shown in **Table 4**. None of the three wines contained culturable *B. bruxellensis*. Only the Côtes du Rhône wine contained a viable population of *B. bruxellensis*, whereas the red wines from Burgundy and Bordeaux did not, validating the cell death caused by the sulfite treatment.

The quantification results using the kits were precise for the same kit and sample (repeatability) for the three red wines.

Table 4

*Analyses of red wines containing *B. bruxellensis* killed by a high sulfite dose (2 mg/L molecular SO₂). The experiments were performed on Côtes du Rhône, Burgundy and Bordeaux red wines. The results are expressed in log₁₀. Total *B. bruxellensis* populations were determined by flow cytometry or microscopy, the culturable populations by plate counting (reference method), and quantification by commercial kits (Kit 1, Kit 2 and Kit 3; alternative method), in triplicate.*

	Methods used	Côtes du Rhone wine	Burgundy wine	Bordeaux wine
Total population	FCM or Microscopy	4.1	5.4	5.5
Viable population	FCM or Microscopy	3.7	0	0
Reference method	Selective medium	0	0	0
Alternative method	Kit 1	5.4 ± 0.1	nd	1.8 ± 0.1
	Kit 2	nd	5.3 ± 0.1	6.1 ± 0.1
	Kit 3	4.6 ± 0.9	5.1 ± 0.0	nd

The viable population in the Côtes du Rhône wine was higher than the culturable population, probably due to viable but non-culturable (VBNC) cells. Kits 1 and 3 led to an overestimation of 1.7 and 0.9 log₁₀ cells/mL, respectively, relative to the viable population determined by FCM combined with viability staining. Such overestimation may come from the quantification of dead cells.

The population levels determined for the Burgundy wine from Kits 2 and 3 were approximately identical to the total population (dead cells).

The quantification of *B. bruxellensis* in the Bordeaux wine by Kit 1 largely underestimated the population (-3.7 log₁₀ cells/mL), whereas Kit 2 led to an overestimation of the population (+0.6 log₁₀ cells/mL).

Quantification of *B. bruxellensis* in five potentially contaminated red wines

B. bruxellensis populations present in five red wines (Wine 1, Wine 2, Wine 3, Wine 4, and Wine 5) from different wineries were determined by plate counting and quantification using the commercial kits. The results are shown in **Table 5**.

Only two results for Wine 1 were not significantly different from the enumeration results by plate counting (from Kit 1 performed by lab 3 and Kit 3 performed by lab 1) (**Table 5**). No culturable cells were detected in Wine 2, whereas there were two positive results from the kit quantifications. The results for Wine 3 were significantly identical to plate counting when the quantifications were performed by lab 3 with Kit 1 and lab 1 with Kit 3. Two quantifications were significantly different from the populations determined by plate counting for Wine 4 (**Table 5**). Wine 5 did not contain culturable *B. bruxellensis*, whereas four kit-based quantifications were positive.

The results of *B. bruxellensis* quantification of naturally contaminated red wines validate the previous results performed in artificially contaminated red wines. The results were similar or the population was underestimated when the yeast was detected by plate counting. No significant overestimation was made for these red wines.

Table 5

*Quantification (log₁₀ cells/mL) of *B. bruxellensis* in five naturally contaminated red wines (Wine 1, Wine 2, Wine 3, Wine 4, and Wine 5) using the commercial kits. The standard deviations were calculated from three independent triplicates. Asterisks indicate data significantly different from plate counting results (ANOVA with a Dunnett test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).*

	Kit 1		Kit 2		Kit 3		Petri dish
	Lab 2	Lab 3	Lab 1	Lab 3	Lab 1	Lab 2	
Wine 1	2.3 ± 1.0**	3.4 ± 0.1	1.8 ± 0.2***	2.4 ± 0.0**	3.3 ± 0.8	0.0 ± 0.0***	3.6 ± 0.3
Wine 2	0.0 ± 0.0	-0.1 ± 0.2*	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.4 ± 0.0***	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Wine 3	0.2 ± 0.3***	1.9 ± 0.1	0.0 ± 0.0***	0.4 ± 0.5***	2.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0***	2.1 ± 0.5
Wine 4	1.4 ± 1.0*	3.0 ± 0.0	1.0 ± 0.1**	1.8 ± 0.2	2.3 ± 1.0	1.5 ± 1.4	2.8 ± 0.4
Wine 5	0.0 ± 0.0	2.3 ± 0.2***	1.1 ± 0.1***	1.4 ± 0.1***	1.5 ± 0.6***	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Discussion

Accuracy profiling was applied to analyze an alternative method against the reference method. In our study, the reference method chosen was plate counting on selective medium as this approach is the most widely used by enological laboratories to study the culturability of this yeast. Three commercial kits that quantify *B. bruxellensis* in red wine were used as the alternative method.

Using a β of 80% and a λ equal to $\pm 0.3 \log_{10}$ cells/mL, none of the kits were validated because the level of *B. bruxellensis* determined by these kits was under or overestimated with a bias that was generally higher than the acceptable limit. Moreover, the predicted results resulted in a large discrepancy, leading to a large uncertainty of future quantifications. However, the quantification results were precise for the same kit and sample (repeatability).

Using the results of the accuracy profile, a correction factor can be applied if, for example, all results are slightly and repeatedly overestimated according to the population levels. However, in our study, the kits sometimes overestimated the population at one level and underestimated it at another. We observed no continuous error between the alternative and reference methods, making it impossible to apply a correction factor to the results. Moreover, as the tolerance intervals were higher than the acceptability limits, no quantification limit could be determined.

These results highlight the poor quantification by the commercial kits, given the experiments were performed by three laboratories specialized in the wine field and in the use of qPCR techniques. It is necessary for all winemakers to use the same quantification methods to monitor *B. bruxellensis* populations. The reference method based on plate counts provides reliable results. Nutritive media have different selectivity and it is essential to always use the same nutritive media to monitor yeast from the same tank throughout vinification and aging. It is also essential to have knowledge and know how in molecular biology and qPCR analysis, because of the sensitivity of the method.

Overestimation of *B. bruxellensis* using the qPCR kits may be due to the presence of VBNC cells in the wine which may not be detectable by plate counting (Du Toit et al., 2005; Millet and Lonvaud-Funel, 2000; Serpaggi et al., 2012). As we show here, it may also be due to the fact that

the kits do not discriminate live from dead or VBNC cells, confirming previous studies (Andorrà et al., 2010; Vendrame et al., 2014; Willenburg and Divol, 2012). Propidium monoazide (PMA) and ethidium monoazide bromide can discriminate between live and dead microorganisms (Andorrà et al., 2010; Rizzotti et al., 2015; Vendrame et al., 2014) and could be used in this context.

The best solution to prevent underestimation is the use of an internal control. The internal control is often a microorganism not found in wine (Longin et al., 2016; Tessonnière et al., 2009) and added to the samples at a known concentration before DNA extraction. If, for example, *Yarrowia lipolytica* is added as an internal control (Tessonnière et al., 2009), a first amplification of this yeast must be performed to validate the quantification. Similar values for the quantification of the internal control and the initial added population that are not significantly different indicate that the DNA extraction yield is acceptable. *B. bruxellensis* quantification is feasible under these conditions.

To conclude, our study highlights that commercial kits for the quantification of *B. bruxellensis* have different extraction yields leading to different quantification results. The drawbacks of the methods described above could negatively affect a winemaker's decision and lead to wine spoilage due to over or underestimation. It is thus necessary to add a standardized qPCR protocol for *B. bruxellensis* quantification in wines. One such standardized protocol based on the work of Tessonnière et al. (2009) which includes a microbial internal control is already available in the OIV methods (OIV-OENO 414-2011). Although longer than commercial kit protocols, it has been shown to be sensitive and efficient. However, in this protocol, the target DNA corresponds to the RAD4 gene. Thus, the amplification of this gene after cell death needs to be assessed to prevent overestimation. Alternatively, the commercial kits could be improved by using both a microbiological internal control and PMA.

Acknowledgements: This work was funded by the Regional Council of Burgundy, the Interprofessional Office of Burgundy Wines (E110CVPARI) and FranceAgriMer (GNBrett project) (7120164497).

References

- Andorrà, I., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J. M., and Mas, A. (2010). Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 257–262.
- Boubetra, A., Le Nestour, F., Allaert, C., and Feinberg, M. (2011). Validation of alternative methods for the analysis of drinking water and their application to *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3360–3367.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., and Boidron, J. N. (1995). The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 463–468.
- Chatonnet, P., Viala, C., and Dubourdieu, D. (1997). Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 443–448.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R., and Comi, G. (2004). Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1347–1355.
- Delaherche, A., Claisse, O., and Lonvaud-Funel, A. (2004). Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and “ropy” *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* 97, 910–915.
- Du Toit, W. J., Pretorius, I. S., and Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.* 98, 862–871.
- Dugelay, I., Gunata, Z., Sapis, J. C., Baumes, R., and Bayonove, C. (1993). Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. *J. Agric. Food Chem.* 41, 2092–2096.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., and Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 329–337.
- Gerbaux, V., Jeudy, S., and Monamy, C. (2000). Étude des phénols volatils dans les vins de Pinot noir en Bourgogne. *Bull. OIV* 73, 581–599.
- Gerbaux, V., Vincent, B., and Bertrand, A. (2002). Influence of maceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot noir wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 131–137.
- Hayashi, N., Arai, R., Tada, S., Taguchi, H., and Ogawa, Y. (2007). Detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts with a loop-mediated isothermal amplification method. *Food Microbiol.* 24, 778–785.

- Hernán-Gómez, S., Espinosa, J. C., and Ubeda, J. F. (2000). Characterization of wine yeasts by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *FEMS Microbiol. Lett.* 193, 45–50.
- Longin, C., Guilloux-Benatier, M., and Alexandre, H. (2016). Design and performance testing of a DNA extraction assay for sensitive and reliable quantification of acetic acid bacteria directly in red wine using real time PCR. *Front. Microbiol.* 7, 831.
- Millet, V., and Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 136–141.
- Phister, T. G., and Mills, D. A. (2003). Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7430–7434.
- Prakitchaiwattana, C. J., Fleet, G. H., and Heard, G. M. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res.* 4, 865–877.
- Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M. C., De Revel, G., and Lonvaud-Funel, A. (2006). Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1208–1219.
- Rizzotti, L., Levav, N., Fracchetti, F., Felis, G. E., and Torriani, S. (2015). Effect of UV-C treatment on the microbial population of white and red wines, as revealed by conventional plating and PMA-qPCR methods. *Food Control* 47, 407–412.
- Röder, C., König, H., and Fröhlich, J. (2007). Species-specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA. *FEMS Yeast Res.* 7, 1013–1026.
- Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., and Loureiro, V. (2001). Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *J. Appl. Microbiol.* 90, 588–599.
- Salma, M., Rousseaux, S., Sequeira-Le Grand, A., and Alexandre, H. (2013). Cytofluorometric detection of wine lactic acid bacteria: application of malolactic fermentation to the monitoring. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 63–73.
- Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., and Alexandre, H. (2012). Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiol.* 30, 438–447.
- Serpaggi, V., Remize, F., Sequeira-Le-Grand, A., and Alexandre, H. (2010). Specific identification and quantification of the spoilage microorganism *Brettanomyces* in wine by flow cytometry: A useful tool for winemakers. *Cytometry A* 77A, 497–499.
- Stender, H., Kurtzman, C., Hyldig-Nielsen, J. J., Sørensen, D., Broomer, A., Oliveira, K., et al. (2001). Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence

in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 938–941.

Tessonnière, H., Vidal, S., Barnavon, L., Alexandre, H., and Remize, F. (2009). Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 129, 237–243.

Vendrame, M., Manzano, M., Comi, G., Bertrand, J., and Iacumin, L. (2014). Use of propidium monoazide for the enumeration of viable *Brettanomyces bruxellensis* in wine and beer by quantitative PCR. *Food Microbiol.* 42, 196–204.

Willenburg, E., and Divol, B. (2012). Quantitative PCR: An appropriate tool to detect viable but not culturable *Brettanomyces bruxellensis* in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 131–136.

Chapitre 5

*Effet du SO₂ sur Brettanomyces.
bruxellensis en vin rouge selon la
souche testée et la concentration
initiale en levure*

Comme nous l'avons vu précédemment, des techniques permettant une quantification plus ou moins efficace de *B. bruxellensis* existent et sont utilisées par les laboratoires d'analyses spécialisés. Cependant, afin d'éviter une contamination ou afin de limiter l'altération lorsqu'une contamination est avérée, les vignerons utilisent majoritairement le dioxyde de soufre. Mais, de nos jours, certains vignerons souhaitent diminuer les doses d'intrants apportés à leur vin afin d'aboutir à des vins biologiques ou naturels issus d'une viticulture limitant également l'utilisation de produits phytosanitaires (agriculture biologique, agriculture raisonnée). Ces nouvelles pratiques entraînent une augmentation des possibilités de contamination. Donc, il faut approfondir les connaissances sur la résistance et l'adaptation de *B. bruxellensis* afin de maîtriser les contaminations tout en diminuant les doses de dioxyde de soufre apportées au vin.

Diverses études ont été menées afin de déterminer les doses de SO₂ moléculaire nécessaire afin de tuer ou inhiber *B. bruxellensis* (Barata et al., 2008; Conterno et al., 2006; Du Toit et al., 2005; Zuehlke et Edwards, 2013). Néanmoins, la plupart de ces études ont été réalisées en milieu synthétique et non en condition vin réel. De plus, l'effet du SO₂ selon la population présente dans le vin n'a pas été étudié. Donc, dans l'optique de mieux connaître et comprendre le comportement de *B. bruxellensis* lors d'un stress sulfite, des expérimentations ont été menées sur différentes souches avec différents niveaux de population en vin rouge contenant différentes doses de SO₂.

Les expérimentations ont été initialement pensées par le groupe GNBrett puisqu'un axe de l'étude interlaboratoires précédemment décrite porte sur l'étude de la réponse de *B. bruxellensis* au stress sulfite. Après la réalisation de pré-tests la première année (validation d'une résistance différente entre les souches, validation des doses de SO₂ moléculaire aboutissant à un état VNC dans certaines conditions), les expérimentations ont été discutées et modifiées afin d'élaborer les conditions nous permettant d'atteindre nos objectifs.

Nous présentons dans ce chapitre les résultats issus de deux souches de *Brettanomyces bruxellensis* inoculées à trois niveaux de population différents dans trois conditions de stress SO₂. Le principal but est d'apporter aux vignerons une solution efficace de contrôle de ce microorganisme en adaptant la dose ajoutée en SO₂ selon la population de *B. bruxellensis*

présente. En complément, nous nous intéresserons à la faculté ou non pour *B. bruxellensis* à produire du 4-éthylphénol lorsqu'elle est en état VNC. En effet les études réalisées jusqu'à ce jour sont contradictoires (Agnolucci et al., 2010; Barata et al., 2008; Du Toit et al., 2005; Serpaggi et al., 2012; Zuehlke et Edwards, 2013).



Efficiency of population-dependent sulfite against *Brettanomyces bruxellensis* in red wine



Cédric Longin*, Claudine Degueurce, Frédérique Julliat, Michèle Guilloux-Benatier, Sandrine Rousseau, Hervé Alexandre

Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France
 Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Equipe VAIMIS, rue Claude Ladrey, BP 27877, F-21078 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 July 2016
 Received in revised form 24 August 2016
 Accepted 17 September 2016
 Available online 19 September 2016

Keywords:

B. bruxellensis
 Molecular sulfite
 VBNC state
 4-EP production
 Red wine

ABSTRACT

Brettanomyces bruxellensis is considered as a spoilage yeast encountered mainly in red wine. It is able to reduce vinylphenols from phenolic acids to ethylphenols. These volatiles are responsible for the phenolic "Brett character" described as animal, farm, horse sweat and animal leather odors. Other molecules are responsible for organoleptic deviations described as "mousiness taint". SO₂ is the product most often used by winemakers to prevent *B. bruxellensis* growth. Usually, the recommended molecular dose of SO₂ (active SO₂, mSO₂) is highly variable, from 0.3 to 0.8 mg/L. But these doses do not take into account differences of strain resistance to sulfites or population levels. Moreover, SO₂ is known as a chemical stressor inducing a viable but nonculturable (VBNC) state of *B. bruxellensis*. These cells, which are non-detectable by plate counting, can lead to new contamination when the amount of sulfite decreases over time. Consequently, we first assessed the effect of SO₂ levels in red wine on two strains with phenotypically different sulfite resistances. Then, we studied the relationship between amounts of SO₂ (0, 0.5, 0.9 and 1.1 mg/L active SO₂) and population levels (10³, 10⁴ and 10⁵ cells/mL) in red wine. Yeasts were enumerated by both plate counting and flow cytometry over time using viability dye. Our results showed different SO₂ resistances according to the strain used. A relationship between yeast population level and SO₂ resistance was demonstrated: the higher the yeast concentration, the lower the efficiency of SO₂. Under certain conditions, the VBNC state of *B. bruxellensis* was highlighted in red wine. Yeasts in this VBNC state did not produce 4-EP. Moreover, cells became culturable again over time. All these results provide new information enabling better management of sulfite addition during wine aging.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Brettanomyces bruxellensis is a yeast with low nutrient requirements, resistant to ethanol (Conterno, Joseph, Arvik, Henick-Kling, & Bisson, 2006), and its low pH resistance allows its implantation in wines both during and after alcoholic fermentation (AF). Although *B. bruxellensis* ferments sugars relatively slowly compared to other yeasts (Peynaud & Domercq, 1956), it is able to ferment grape juice and produce ethanol at varying amounts from 3.5 to 11% (v/v) ethanol, according to the strain used. *B. bruxellensis*, like other microorganisms, can decarboxylate cinnamic acids naturally present in wine to vinylphenols via cinnamate decarboxylase, which converts the *p*-coumaric, ferulic and caffeic acids to 4-vinylphenol, 4-vinylguaiaicol and 4-vinylcatechol, respectively (Oelofse, Pretorius, & Du Toit, 2008). Moreover, *B. bruxellensis* is also able to reduce vinylphenols to ethylphenols via the sequential activity

of a second enzyme. Vinylphenol reductase converts 4-vinylphenol, 4-vinylguaiaicol and 4-vinylcatechol to 4-ethylphenol, 4-ethylguaiaicol and 4-ethylcatechol, respectively (Oelofse et al., 2008). These volatile and odoriferous molecules cause the phenolic and animal character known as "Brett character" (Chatonnet, Dubourdieu, Boidron, & Pons, 1992). This phenolic characteristic is marked from 600 µg/L, but the rejection threshold, also known as the limit threshold, is 420 µg/L for a mixture containing 4-ethylphenol and 4-ethylguaiaicol (10:1) in red wines (Chatonnet, Dubourdieu, & Boidron, 1992). Other molecules are responsible for organoleptic deviations described as responsible for the "mouse taste" produced by *B. bruxellensis* and certain *Lactobacillus* spp. (Grbin et al., 1995; Heresztyn, 1986). *B. bruxellensis* can produce two tautomers: 2-acetyltetrahydropyridine (ATHP) and 2-ethyltetrahydropyridine (ETHP) (Snowdon, Bowyer, Grbin, & Bowyer, 2006). The first compound has a threshold at 1.6 µg/L and about 100 times lower than that of ETHP (Craig & Heresztyn, 1984; Teranishi, Buttery, & Guadagni, 1975). Different treatments are available to prevent contamination by *B. bruxellensis* and the resulting wine spoilage it causes. Regarding physical treatments, the most common are flash

* Corresponding author at: Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France.

E-mail address: cedric.longin@u-bourgogne.fr (C. Longin).

pasteurization and membrane filtration (curative treatments) whereas chemical treatments mainly use chitosan (preventive treatment) (Kong, Chen, Xing, & Park, 2010) or sulfite (preventive and curative treatment) (Beech & Thomas, 1985). Thus SO₂ is usually used by winemakers to prevent *B. bruxellensis* growth. Evaluating the effectiveness of sulfite is difficult because *B. bruxellensis* is rather sulfite tolerant (Barata et al., 2008). Furthermore, sulfite tolerance is strain dependent (Curtin, Kennedy, & Henschke, 2012). Indeed, according to different studies, sulfite tolerance varies up to fivefold (Agnolucci et al., 2010; Barata et al., 2008; Curtin et al., 2012). Concentrations of 0.2 to 0.5 mg/L molecular SO₂ (active SO₂ or mSO₂) typically inhibit growth in wines (Barata et al., 2008; Conterno et al., 2006; Du Toit, Pretorius, & Lonvaud-Funel, 2005). However, sulfite has been reported to induce a Viable But Non-Culturable (VBNC) state in *B. bruxellensis* cells (Agnolucci et al., 2010; Du Toit et al., 2005; Serpaggi et al., 2012). These cells not detectable by plate counting can lead to new contamination when the amount of sulfite decreases over time. The existence of a VBNC-like phenomenon in *B. bruxellensis* was suggested and observed for *B. bruxellensis* strain B3a at 10⁵ cells/mL (Du Toit et al., 2005) in red wine when the level of molecular SO₂ was between 0.25 and 0.8 mg/L after 2 days. However, Barata et al. (2008) did not observe the existence of an active but non-culturable population after the addition of SO₂ in wine (0.66–1.0 mg/L). Agnolucci et al. (2010) also indicated that SO₂ is a chemical stressor inducing VBNC state in *B. bruxellensis* grown in synthetic wine medium according to the doses and strains used. Serpaggi et al. (2012) validated the VBNC state for *B. bruxellensis* strain LO2E2 at 10⁷ cells/mL in synthetic wine medium. This VBNC state was induced by 0.8 mg/L mSO₂, leading to a 22% decrease of cell size of the yeasts. Recently, Zuehlke and Edwards (2013) studied the effects of different molecular sulfite levels (0.2–1.1 mg/L mSO₂) on various *B. bruxellensis* strains that support the existence of a VBNC state. This yeast also seemed able to conserve the ability to produce 4-ethylguaiacol and 4-ethylphenol during this state (Serpaggi et al., 2012). However, certain studies (Agnolucci et al., 2010; Zuehlke & Edwards, 2013) were in disagreement with that of Serpaggi et al. (2012). Moreover, none of these experiments studied the *B. bruxellensis* tolerance according to the initial population levels (cell concentration). Moreover, most of the studies were performed in synthetic medium with or without ethanol (Curtin et al., 2012; Vigentini, Joseph, Picozzi, Foschino, & Bisson, 2013). In order to better manage or optimize sulfite addition, we investigated the effects of different sulfite levels on different *B. bruxellensis* concentrations in red wine for two different strains.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strains and wine adaptation

B. bruxellensis strains LO2E2 and CRB Oeno LO417, isolated respectively from Burgundy red wine by the "Institut Technique de la Vigne et du Vin" (ITV, Beaune, France) and from Bordeaux red wine by the "Institut des Sciences de la Vigne et du Vin" (ISVV, Bordeaux, France) were used. To adapt cells to ethanol, firstly they were grown on YPD agar (10 g/L yeast extract, 20 g/L bacto-peptone, 20 g/L glucose, 20 g/L agar) at 28 °C for 5 days. Then, a liquid culture was obtained for each strain in YPD medium supplemented with ethanol 5% (v/v). Cells in stationary phase were used to inoculate diluted red wine (50% red wine: 50% physiological water) and incubated for one week at 28 °C. These adapted cells were then used to inoculate red wine.

2.2. Experimental conditions

Red wine elaborated from Pinot Noir grapes came from the vineyard of the University of Burgundy. All wine samples were filtered using a vacuum driven filtration system through a 0.22 µm sterile membrane (Stericup-GP, polyethersulfone, SCGPU05RE, Millipore Express® Plus Membrane). 200 µL were used to determine pH and alcohol levels by

the OenoFoss instrument (FOSS™) using the Fourier Transform Infra-Red (FT-IR) spectroscopy method. Red wine used in this study had a pH of 3.3 and an ethanol level of 12.5% (v/v).

Experiments were carried out in 120 mL bottles plugged with screw caps and a silicon septum allowing aseptic sampling using a syringe. Argon gas was injected into the bottle which increases the internal pressure leading to a rise of the liquid sample in the second syringe. This system prevents wine oxygenation by replacing sampled wine by Argon gas. Each condition was repeated in triplicate and incubated at 22 °C.

2.3. Free SO₂ determination in red wine

The automated Ripper method (iodometric titration) coupled to a voltametric and amperometric probe (Mettler Toledo, DM143-SC; double pin platinum electrode) was used to measure the value of free SO₂ in the red wine using a titrator (Mettler Toledo, DL50). Before titration, 1.4 mL potassium iodide (30% w/v) and 2 mL sulfuric acid (30% v/v) were added to 50 mL of wine sample to stabilize and acidify the solution respectively. The titration was performed thanks to an iodine solution (0.01 M).

Under our conditions, 25, 36 and 43 mg/L total SO₂ were added to the red wine from an SO₂ solution at 5% (v/v), leading to measurements of free SO₂ levels at 10, 16 and 20 mg/L respectively. Molecular SO₂ values were calculated using the algorithm available in the "Institut Français de la Vigne et du Vin" (<http://www.vignevin-sudouest.com/services-professionnels/formulaires-calcul/so2-actif.php>) which takes into account the effect of the temperature, ethanol and pH on the molecular sulfite concentration (OIV method: OIV-MA-AS323-04C). The mSO₂ values reached in our conditions were 0.5, 0.9, and 1.1 mg/L mSO₂, respectively.

To study yeast response after removal the inhibition of cell growth due to the mSO₂, the pH level was increased to 4 with NaOH (10 M) to decrease the concentration of molecular sulfite to almost 0 mg/L.

2.4. Growth monitoring

Cells in stationary phase adapted to wine were used to inoculate wine at 10³, 10⁴ and 10⁵ cells/mL and then sulfite was added when indicated. 2.5 mL were sampled for each analysis point. Flow cytometry (cf 2.4.2) was used to determine the cell viability in adapted and inoculated wine.

2.4.1. Culturability assays

During the experiments, each sample was enumerated by plate count on solid selective medium (ITV medium) (Gerbaux, Jéudy, & Monamy, 2000; Rodrigues, Gonçalves, Pereira-da-Silva, Malfeito-Ferreira, & Loureiro, 2001). This medium is composed of 10 g/L yeast extract, 20 g/L bacto-peptone, 20 g/L glucose, 0.1 g/L *p*-coumaric acid, 0.1 g/L ferulic acid, 0.03 g/L bromocresol green, 0.2 g/L chloramphenicol, 0.006% (w/v) cycloheximid, 20 g/L agar and pH is adjusted to 5.

2.4.2. Viability assays

To determine yeast viability, 500 µL of red wine containing *B. bruxellensis* were centrifuged at 9000g for 5 min. Cells were resuspended in 500 µL of FDA buffer (0.5 M Na₂HPO₄ and 0.5 M NaH₂PO₄; pH 7). Cells were stained for 15 min with fluorescein diacetate (FDA) (Thermo Fisher Scientific, Molecular Probes™, F1303), at a final concentration of 15 mM in buffer (Salma, Rousseaux, Sequeira-Le Grand, Divol, & Alexandre, 2013; Serpaggi et al., 2012). The suspension of stained cells was analyzed by flow cytometry (FCM) with a BD C6 ACCURI flow cytometer using blue line excitation at 488 nm. Green fluorescence was read using the detector with a 530 nm ± 15 nm bandpass filter. Measurements were processed with BD Accuri software and the results are expressed as the number of viable yeast cells per milliliter. The ability of FDA to stain viable cells is based on its cleavage in living cells, by

membrane esterases during active metabolism (Schnürer & Rosswall, 1982). For each sample, 20 µL were analyzed by flow cytometry to enumerate viable populations.

2.5. Cell permeability determination

To determine yeast permeability, 500 µL of red wine containing *B. bruxellensis* was centrifuged at 9000g for 5 min. Cells were resuspended in 500 µL of PBS 1× (Biosolve, 10× concentrate Molecular biology, 162323; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, Na₂HPO₄ 10 mM and 1.8 mM KH₂PO₄) (Salma, Rousseaux, Sequeira-Le Grand, & Alexandre, 2012). Cell permeability was determined by cell staining with propidium iodide (PI) (ThermoFisher Scientific, Molecular Probes™, P-3566) is not permeant to live cells; it is also commonly used to detect dead cells in a population (Branco, Viana, Albergaria, & Arneborg, 2015) and used at 2 µM (final concentration). DiBAC4(3) (ThermoFisher Scientific, Molecular Probes™, B-438) was used at 6 µM (final concentration). This compound is used as a cell counterstain. It binds to intracellular proteins or membrane and exhibits enhanced green fluorescence. The cell suspensions were incubated at room temperature for 15 min in the dark before being analyzed by FCM. PI and DiBAC4(3) were excited by the flow cytometer laser at 488 nm and emitted fluorescence collected by the filters 525 ± 15 nm and 670 longpass, respectively. 20 µL were used to enumerate the population for each sample by flow cytometry.

2.6. Cell size determination

Yeast cell size was determined by FCM and more particularly by the median values of the Forward Scatter (FSC) (relative unit). The ratio between cell size at a given time and initial cell size were calculated (Supplementary material 1). Cell size was assayed for triplicate independent biological cultures for each treatment.

2.7. UHPLC determination of 4-ethylphenol (4-EP) concentration

4-EP concentration in wine was determined according to the method described in previous studies (Larcher et al., 2007; Nicolini, Larcher, Bertoldi, Puecher, & Magno, 2015). For these experiments, samples of red wine were enriched initially with 5 mg/L *p*-coumaric acid. Wines were centrifuged at 9000g for 5 min at room temperature to eliminate yeasts and recover only the supernatant prior to performing analyses. The equipment used was an HClass UPLC system (Waters) equipped with a fluorescence (FLR) detector used for the analysis. The 4-EP produced was quantified over time. A Coreshell Raptor ARC-18 column (2.7 µm; 100 × 3.0 mm; 9314A1E) was used. Under the optimized conditions, the column oven and the sample system were thermostated at 30 °C and 8 °C, respectively. 2 µL of the sample were injected. Two solvents were used (A and B). Water-acetonitrile-formic acid 100:1.25:0.05 (v/v) was used as solvent A, and acetonitrile-formic acid 100:0.1 (v/v) was used as solvent B. The optimized conditions consisted in a stepwise gradient as follows: 32% B (0–1.5 min), 35% B (1.5–2 min), 100% B (2–5 min). This was followed by a 6 min equilibration period with the initial conditions before the injection of the next sample. The flow rate was set to 1.3 mL/min. Excitation was performed at 280 nm and detection at 305 nm. Data analysis and peak integration were carried out using Waters Empower II software. The 4-EP quantification was calculated by the comparison between the area value obtained from the samples analyzed and the peak area of the standard selected. Five concentrations from 0.1 to 2 mg/L analyzed in triplicate were used to elaborate the standard curve ($r^2 = 0.9906$) (data not shown). The identification of the 4-EP observed was based on their retention time compared with those of the standards tested as well as their spectral characteristics.

3. Results

3.1. Growth monitoring of *B. bruxellensis* in red wine

B. bruxellensis populations of LO2E2 and LO417 were monitored in red wine after the addition of different molecular sulfite levels. The populations of both strains were able to grow in the wine without added sulfite and reached 10⁶ cells/mL whatever the initial cell population (10³, 10⁴ or 10⁵ cells/mL) (Figs. 1 and 2). Population results for the strain LO2E2 were also described in the Supplementary material 2.

For strain LO2E2 inoculated at 10³ cell/mL, the addition of 0.5 mg/L molecular SO₂ led to the decline of *B. bruxellensis* viability and culturability to undetectable levels after sulfite addition and until the end of the experiment (Fig. 1a). On the contrary, regarding strain LO417 under the same experimental conditions, although cultivable and viable cells could no longer be observed 24 h after sulfite addition, both viable and culturable cells could be detected at day 5 and could sustain growth.

For a higher initial LO2E2 population (10⁴ cells/mL) (Fig. 1b), the addition of 0.5 mg/L mSO₂ was as effective as for lower populations (no culturable or viable cells). This was not the case for strain LO417 (Fig. 2b). Indeed, at 10⁴ cells/mL, 0.5 mg/L sulfite addition led to a 1 to 1.5 log decline in the first days after which *B. bruxellensis* LO417 was able to grow again to reach a level similar to that of the wine without sulfite.

When the initial LO2E2 population was higher (10⁵ cells/mL) and with 0.5 mg/L mSO₂, a viable population was detected after 14 days (Fig. 1c). *B. bruxellensis* LO2E2 could be cultivated again after 30 days. This difference in viability and culturability is characteristic of the VBNC state.

This is confirmed for strain LO417 with a higher sulfite level. Fig. 2 shows that for a higher sulfite level (0.9 mg/L) no increase in the culturable and viable cells could be detected whatever the initial population. However, it is worth noting that after a certain period viable and culturable cells could be observed again depending on the initial population (Fig. 2). Another striking feature of our study is that growth recovery appears sooner for wine containing the highest population (Fig. 2c). This is also true for LO2E2: 0.5 and 0.9 mg/L are very efficient in treating wine contaminated with 10³ or 10⁴ cells/mL, while growth recovery is observed for an initial population of 10⁵ cells/mL (Fig. 1c). Similar results are observed for 1.1 mg/L mSO₂.

To confirm the population effect on sulfite efficiency, correlative test (Pearson correlation) was done. Results between the different experiments are shown in the Supplementary material 3. The strain LO2E2 (Supplementary material 3a) inoculated at 10⁵ cells/mL with 0.5 and 0.9 mg/L mSO₂ is not correlated to results from red wine with 10³ and 10⁴ cells/mL at these same sulfite levels which reflects a population effect. With 1.1 mg/L mSO₂, most results are correlated which was expected since with high mSO₂ level no more cultivable cells could be detected.

For the second strain LO417 (Supplementary material 3b), results from red wines inoculated at 10³, 10⁴ and 10⁵ cells/mL incubated with 0, 0.5 and 0.9 mg/L mSO₂ are correlated. So, for a same sulfite level no population effect is highlighted. However, viability of this strain when it was inoculated at 10⁵ cells/mL and incubated with 1.1 mg/L mSO₂ is not correlated to results from population levels 10³ and 10⁴ cells/mL. So, a population effect is highlighted regarding cell viability in these conditions.

It is noteworthy that culturable cells were observed while no viable cells could be detected in the following conditions: day 4 of the Fig. 2a for 0.5 mg/L mSO₂; day 14 of the Fig. 2b for 0.9 mg/L mSO₂ and day 17 of the Fig. 2c for 0.9 mg/L mSO₂. This is probably due to the FCM detection limit (>100 cells/mL) compared to plate counting.

In addition to FDA staining, cells were stained with PI, highlighting cell permeability for experiments initially inoculated at 10⁵ cell/mL (Fig. 3). For both strains LO2E2 and LO417, sulfite addition led to a rapid increase of cell permeability whatever the mSO₂ level reflecting

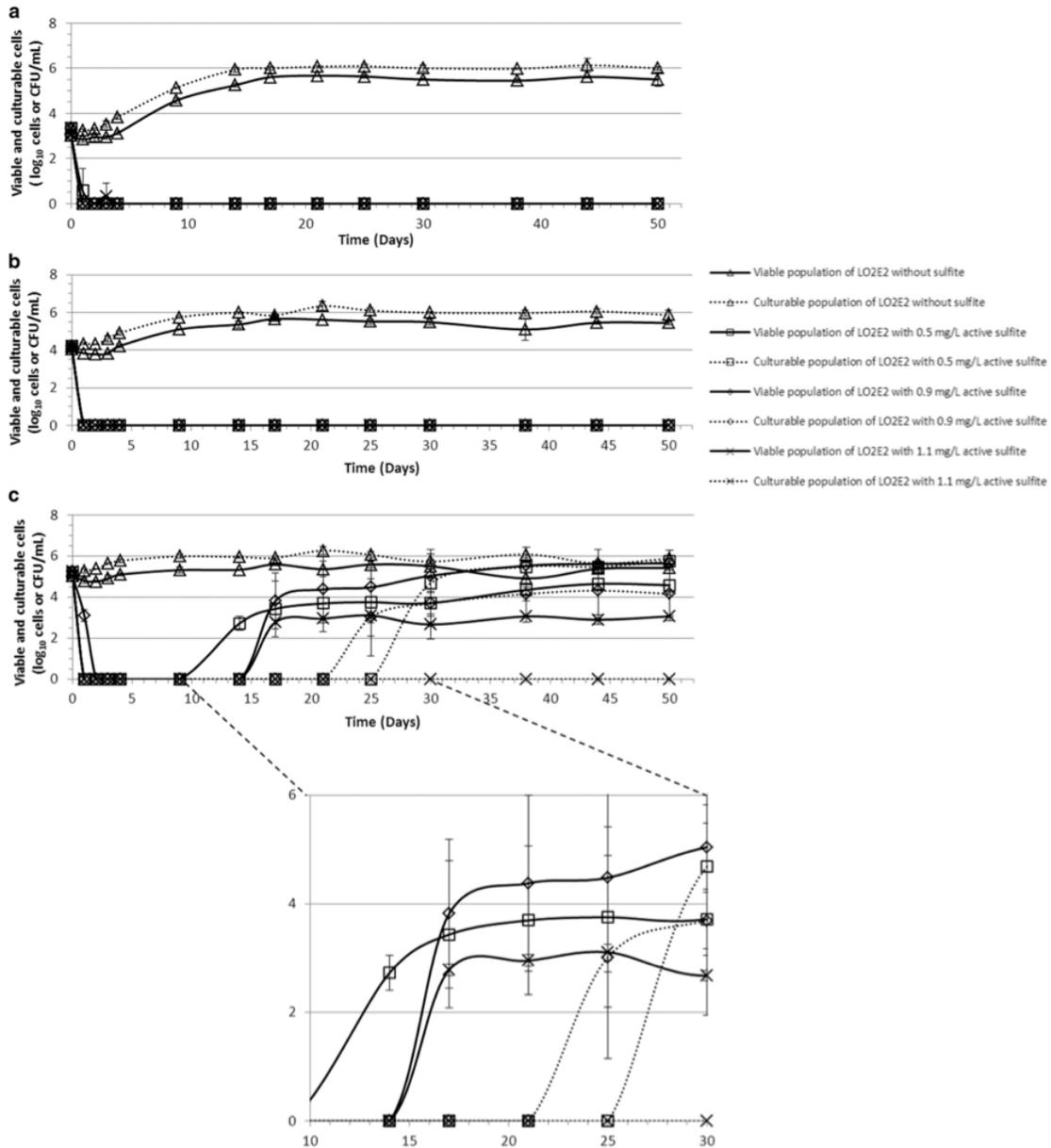


Fig. 1. Viable and culturable population of *B. bruxellensis* LO2E2 over time in red wine without SO₂ and with 0.5, 0.9 and 1.1 mg/L mSO₂. Initial populations were about 10³ (a), 10⁴ (b) and 10⁵ (c) cells/mL. Error bars represent standard deviations of three independent enumerations. Viable cells were determined by FCM using FDA. Culturable cells were enumerated by plate count on solid medium.

damaged membranes. For both strains, without mSO₂ or in presence of 0.5 and 0.9 mg/L mSO₂, a statistical decrease in cell permeability between two days of analysis was highlighted. Cell permeability decrease corresponds to the entry of cells in the stationary phase (Figs. 1 and 2). Regarding cells with 1.1 mg/L mSO₂, no statistical decrease could be observed (Fig. 3a and b). The decrease in permeability is much more noticeable for strain LO417. Based on the permeability results obtained, LO417 seemed to counteract the sulfite better than LO2E2, which in part may explain its better sulfite tolerance.

3.1.1. VBNC state

For both strains at 10⁵ cells/mL, after sulfite addition at 0.9 and 1.1 mg/L mSO₂, it was surprising to observe that although no viable and/or culturable cells could be observed, after a variable lag phase, viable cells could be measured while no culturable cells were detected. However when strain LO417 was incubated with 0.9 mg/L mSO₂, both viability and culturability were restored at the same time. For this strain, in presence of 1.1 mg/L mSO₂, the cell viability was restored whereas no culturability was detected. This observation is characteristic of a VBNC

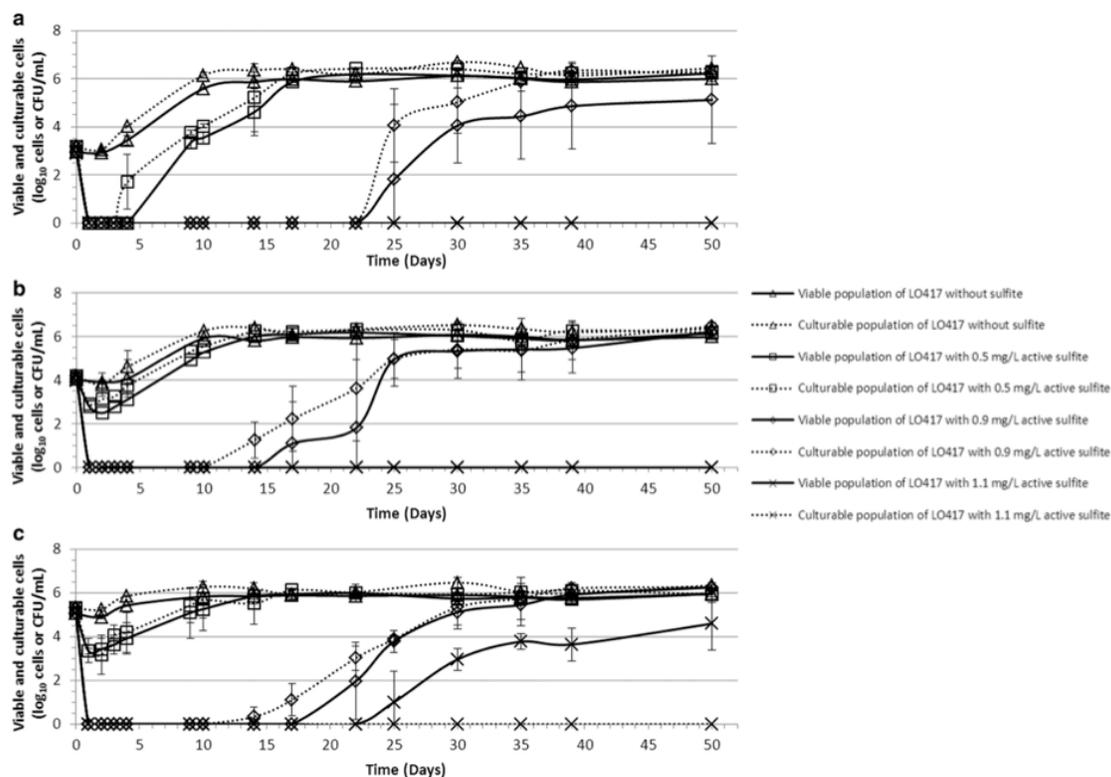


Fig. 2. Viable and culturable population of *B. bruxellensis* LO417 over time in red wine without SO₂ and with 0.5, 0.9 and 1.1 mg/L mSO₂. Initial populations were about 10³ (a), 10⁴ (b) and 10⁵ (c) cells/mL. Error bars represent standard deviations of three independent enumerations. Viable cells were determined by FCM using FDA. Culturable cells were enumerated by plate count on solid medium.

state. Our study confirms that sulfite is able to induce VBNC cells. As stated above, VBNC cells were observed under several conditions. For strain LO2E2, viable cells were detected by flow cytometry in the wine initially containing 10⁵ cells/mL with 0.5, 0.9 and 1.1 mg/L mSO₂. In presence of 0.5 and 0.9 mg/L mSO₂, growth recovery could be measured later in (Fig. 1c). However in presence of 1.1 mg/L sulfite, while a small proportion of yeast (10³ cells/mL) was still viable after 50 days, no recovery of growth could be observed.

To study the cell behavior after elimination of the sulfite stress, the pH of the wine was raised to 4 in order to decrease mSO₂ concentration and consequently relieve sulfite stress to assess whether the cells were able to exit VBNC state.

For strain LO2E2 (Fig. 4a) at 10⁵ cells/mL initially in red wine with 0.9 mg/L active SO₂, cell viability was observed after 18 days without cell detection using a Petri dish. At 1.1 mg/L active SO₂, no culturability was found after increasing pH. Regarding FCM analysis, viability was detected the 49th day.

However, when pH was increased for strain LO417 (Fig. 4b), both viability and culturability were recovered immediately afterwards (day 10, 14) when initial levels of active sulfite were 0.9 and 1.1 mg/L.

In addition to FDA staining, cells were also stained with PI after increasing pH. The LO2E2 cell population, which did not show growth recovery after increasing pH were still stained with PI (Fig. 5a). On the contrary, strain LO417 presented a significant decrease of permeability from day 22 corresponding to the moment when part of the cell population reached the stationary phase (Fig. 5b). These results validated the previous results which highlighted an improvement of the cells permeability at the beginning of the stationary phase. So, the physiological state of the cells improved during growth, as shown by the decrease of cell permeability.

3.2. Evolution of cell size over time of *B. bruxellensis* incubated in red wine

The relative cell size of *B. bruxellensis* strain LO2E2 over time in red wine containing SO₂ or not is presented in Fig. 6a. The size of this strain doubled over time without SO₂ after 4 days. In red wine with 0.5 and 0.9 mg/L mSO₂, the size of the cells began to increase after 30 days and reached a maximum after 40–45 days. The results for *B. bruxellensis* strain LO417 are presented in Fig. 6b. Cell size doubled after 4, 14, 30 days when cells were grown in red wine without mSO₂, with 0.5 and 0.9 mg/L mSO₂ respectively. Regarding cells incubated for 50 days in red wine containing 1.1 mg/L mSO₂, cell size at the end of the experiment was 1.7 times larger than the initial size.

Cell size was also determined when the pH of the red wine initially containing 10⁵ cells/mL with 0.9 and 1.1 mg/L mSO₂ was increased to 4 after 9 days incubation. Regarding strain LO2E2, no evolution of size was detected over time after increasing pH (Supplementary material 4), which is consistent with the absence of culturability. The cell size of strain LO417 doubled after 22 days (Supplementary material 4) corresponding to the time when cells recovered viability and culturability and reached the stationary phase after a pH increase.

3.3. 4-Ethylphenol production

To determine if *B. bruxellensis* in VBNC state was able to produce 4-EP, this compound was monitored in a wine enriched with 5 mg/L *p*-coumaric acid inoculated with strain LO2E2 at 10⁵ cells/mL and with three different mSO₂ levels (Fig. 7).

As shown in Fig. 7a, in the absence of sulfite, LO2E2 produced 4-EP which is detected after 9 days. 4-EP increased over time to 1.1 ±

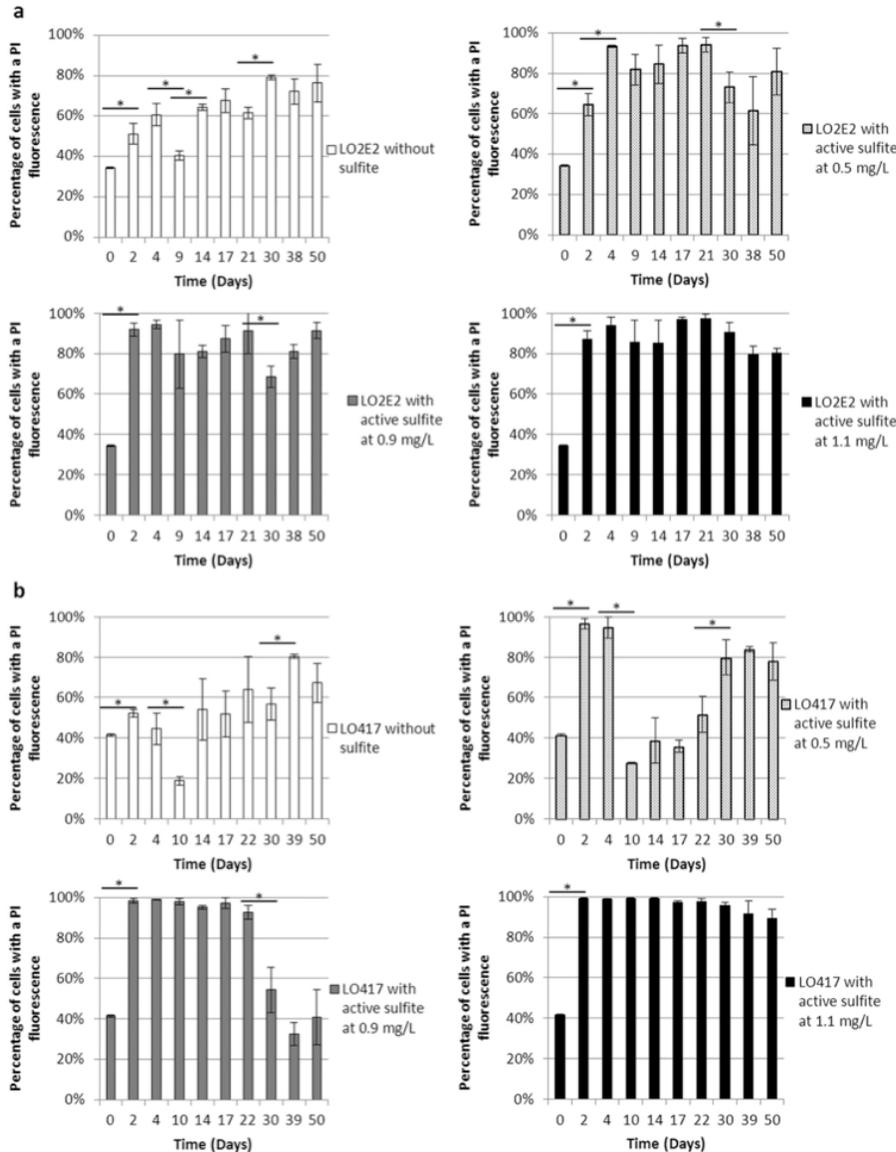


Fig. 3. Percentages of permeable *B. bruxellensis* LO2E2 (a) and LO417 (b) without sulfite, with 0.5 mg/L mSO₂, with 0.9 mg/L mSO₂ and with 1.1 mg/L mSO₂. The initial inoculation of each strain was 10⁵ cells/mL. Measurements were performed over time in red wine. Error bars represent standard deviations at least two independent experiments. Asterisks indicate expression data significantly different (*t*-test, **p* < 0.05) between two days of analysis.

0.1 mg/L at the end of the experiment. This production occurred roughly between the mid-exponential growth phase and the beginning of the stationary phase.

With 0.5 mg/L active sulfite (Fig. 7b), 4-EP detection began after 21 days and increased over time until 1.8 ± 0.1 mg/L at the end of the experiment. During this experiment, VBNC cells were present at 4 and 9 days. Indeed, during this period, no cell was detected on Petri dishes whereas viable cells were detected by FCM. 4-EP production began when yeast culturability was restored and when the cells were in the exponential growth phase. 4-EP production continued during the stationary phase.

With 0.9 mg/L active sulfite (Fig. 7c), 4-EP detection began after 30 days and increased over time until 0.7 ± 0.3 mg/L at the end of the experiment. During this experiment, at 4, 9 and 14 days, no cells were detected on Petri dishes although they were viable. Thus cells in VBNC

state could not produce 4-EP, which could only be detected after growth recovery (after day 20) (Fig. 7c).

No 4-EP production was detected over time with 1.1 mg/L active sulfite (Fig. 7d). Cells presented viability but no culturability during this experiment. Our results confirmed that cells in VBNC state cannot produce 4-EP, although the viable population reached 10⁴ cells/mL, a sufficient population level to produce volatile phenols when cells are culturables (Fig. 7b).

4. Discussion

B. bruxellensis is a real problem in the wine field due to its spoilage properties. Numerous recommendations exist. For example, Barata et al. (2008) considered that a mSO₂ level of 1 mg/L is necessary to control *B. bruxellensis* in wine while Curtin, Varela, and Borneman (2015) and

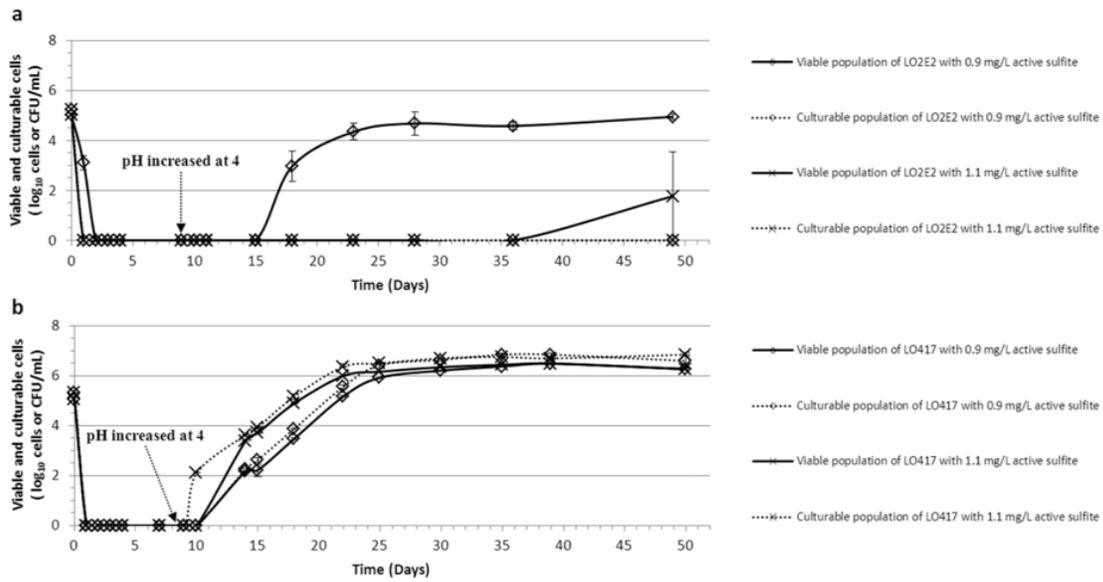


Fig. 4. Growth monitoring of *B. bruxellensis* LO2E2 (a) and LO417 (b) over time in red wine containing 0.9 and 1.1 mg/L mSO₂ when the pH was increased to 4 at day 9. The initial viable population of each yeast was 10³ cells/mL. Error bars represent standard deviations of three independent enumerations. Total and viable (FDA) cells were determined by FCM. Culturable cells were enumerated by plate count on solid medium.

Zuehlke and Edwards (2013) reported that 0.6 and 0.4 mg/L, respectively, are the minimums required to decrease the probability of *B. bruxellensis* spoilage in wine. These conflicting reports show that effective management of sulfite levels is not easy. Indeed, *B. bruxellensis* tolerance to sulfite is strain dependent and also depends on environmental

parameters such as temperature and pH (Zuehlke & Edwards, 2013). This yeast can grow during red wine aging in oak barrels, particularly when mSO₂ is low (<0.5 mg/L), pH is high (>3.8) and temperature is above 15 °C (Benito, Palomero, Morata, Calderón, & Suárez-Lepe, 2009). In our opinion, there are at least two other explanations which

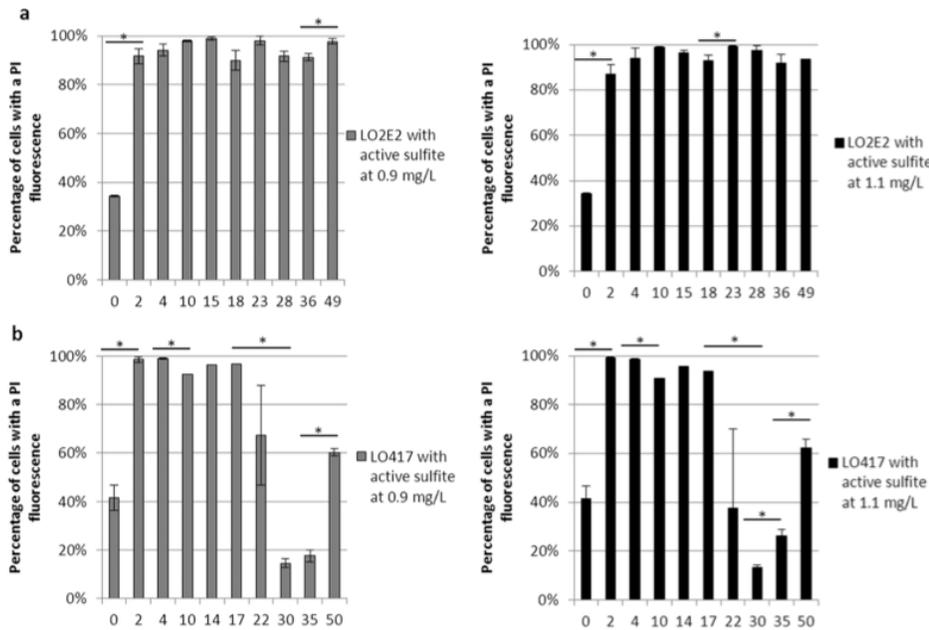


Fig. 5. Percentages of permeable *B. bruxellensis* LO2E2 with 0.9 mg/L mSO₂ (a) or with 1.1 mg/L mSO₂ (b) and LO417 with 0.9 mg/L mSO₂ (c) or with 1.1 mg/L mSO₂ (d) cells when pH was increased to 4 after 9 days of incubation at 22 °C. The initial inoculation of each strain was 10³ cells/mL. Measurements were performed over time in red wine containing different amounts of mSO₂. Error bars represent standard deviations for at least two independent experiments. Asterisks indicate expression data significantly different (t-test, *p < 0.05) between two days of analysis.

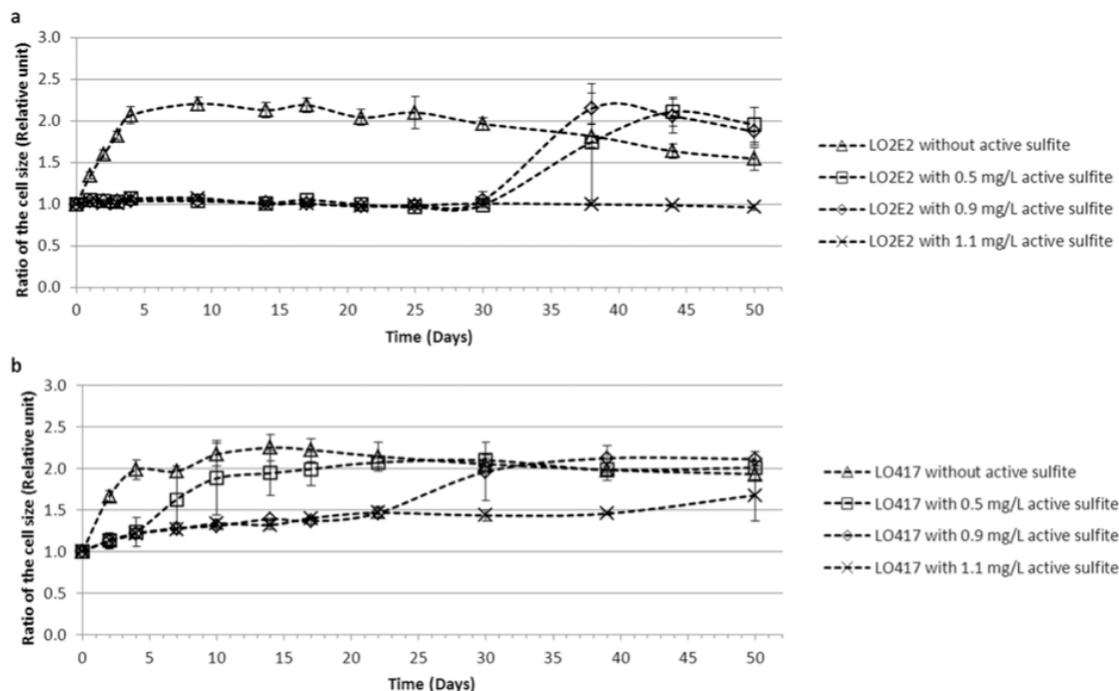


Fig. 6. Ratio between the cell size over time (values of the median FSC (relative unit) determined by FCM) and the initial cell size of *B. bruxellensis* LO2E2 (a) and LO417 (b) when they inoculated at 10⁶ cells/mL in triplicate. Measurements were performed over time in red wine containing different amounts of active SO₂.

could explain why the amounts of mSO₂ required can vary. Indeed, it has been shown that *B. bruxellensis* is able to enter a VBNC state following sulfite addition (Agnolucci et al., 2010; Du Toit et al., 2005; Serpaggi et al., 2012) and that once sulfite declines over time, these cells are able to recover growth (Zuehlke & Edwards, 2013).

Using different sulfite levels in red wines inoculated by two different strains, our results confirmed that SO₂ resistance is strain dependent since strain LO2E2 was more sensitive than LO417 to the active SO₂ levels tested. In a genetic study, Conterno et al. (2006) separated *B. bruxellensis* into two distinct groups. Strains belonging to one of these two groups showed higher sulfite tolerance. Curtin et al. (2012) confirmed these results and showed that variable sulfite tolerance for the wine spoilage yeast *B. bruxellensis* can be linked to genotype markers. Barata et al. (2008) studied the behavior of these yeast species in red wines containing sulfite. Seven out of seventeen *B. bruxellensis* strains were killed from 0.66 to 1.0 mg/L mSO₂ when the cell population was about 10⁶ cells/mL.

Using FCM coupled to a viability dye (FDA), we highlighted the VBNC state of the strain LO2E2 at different mSO₂ levels and at only 1.1 mg/L mSO₂ for the second strain, LO417. The VBNC state of *B. bruxellensis* is controversial in the literature although Agnolucci et al. (2010), Du Toit et al. (2005), Serpaggi et al. (2012) and Zuehlke and Edwards (2013) demonstrated this state in synthetic wine medium and in wine. However, Barata et al. (2008) did not report any VBNC cells after incubation of *B. bruxellensis* with SO₂ in red wine. As shown by our results, these discrepancies seem to be linked to the strain and to the experimental conditions, since in this study, VBNC state was not observed under all the conditions tested. In order to detect VBNC cells, a positive signal using a viability dye should be detected during the period when cells cannot be cultivated. However, the detection of the viability dye is dependent on cell permeability. Indeed, loss of stainability is considered to be a consequence of fluorescein leakage from the cells with compromised membranes (Bouix & Leveau, 2001). In our study, we showed that sulfite leads to increased cell permeability, as shown

by staining with PI which confirmed previous results (Zuehlke & Edwards, 2013). Cells positive to PI possess a compromised membrane after sulfite stress which could explain why they could not be detected by viability test such as FDA. This hypothesis agreed with the results obtained by Divol and Lonvaud-Funel (2005). Indeed, *Saccharomyces* cells were barely detectable by epifluorescence after sulfite addition. Moreover, this hypothesis could explain that under rare conditions cells are culturable but no viable cells are detected. A statistical decrease of the cell permeability was highlighted only at the beginning of the stationary phase. This means that an adaptation of the membrane occurs during their growth.

Under our conditions, VBNC cells could be more easily observed with the sulfite tolerant strain LO417 which possesses lower permeability (lower permeability means lower FDA leak and better staining), thereby supporting our hypothesis. However, this needs to be confirmed using more different *B. bruxellensis* strains.

In summary, after sulfite stress, cells exist in different physiological states depending on the strain (culturable, viable, VBNC, dead). However, discrepancies between studies could be explained by stain efficiency which is linked to cell permeability.

Moreover, our results highlight the ability of *B. bruxellensis* strains to regain viability and culturability under certain conditions. This increase of viability might reflect progressive adaptation allowing the detection of cells stained with FDA. Divol, Du Toit, and Duckitt (2012) speculated that removal of SO₂ from the environment may result in exit from VBNC state. Exit from VBNC state is another concern regarding *B. bruxellensis* spoilage. Indeed, if *B. bruxellensis* is able to exit from VBNC state it is necessary to take this state into account to prevent future spoilage. However, in our study, regarding LO2E2 only, increasing pH did not allow exit from VBNC state, contrary to the results obtained by Serpaggi et al. (2012) and Salma et al. (2013) in synthetic wine. pH increase was also found to be inefficient to trigger VBNC exit in *S. cerevisiae* (Salma, 2013). However, it seems that exit from VBNC is not only dependent on mSO₂ levels. In their study, Zuehlke and Edwards (2013) observed

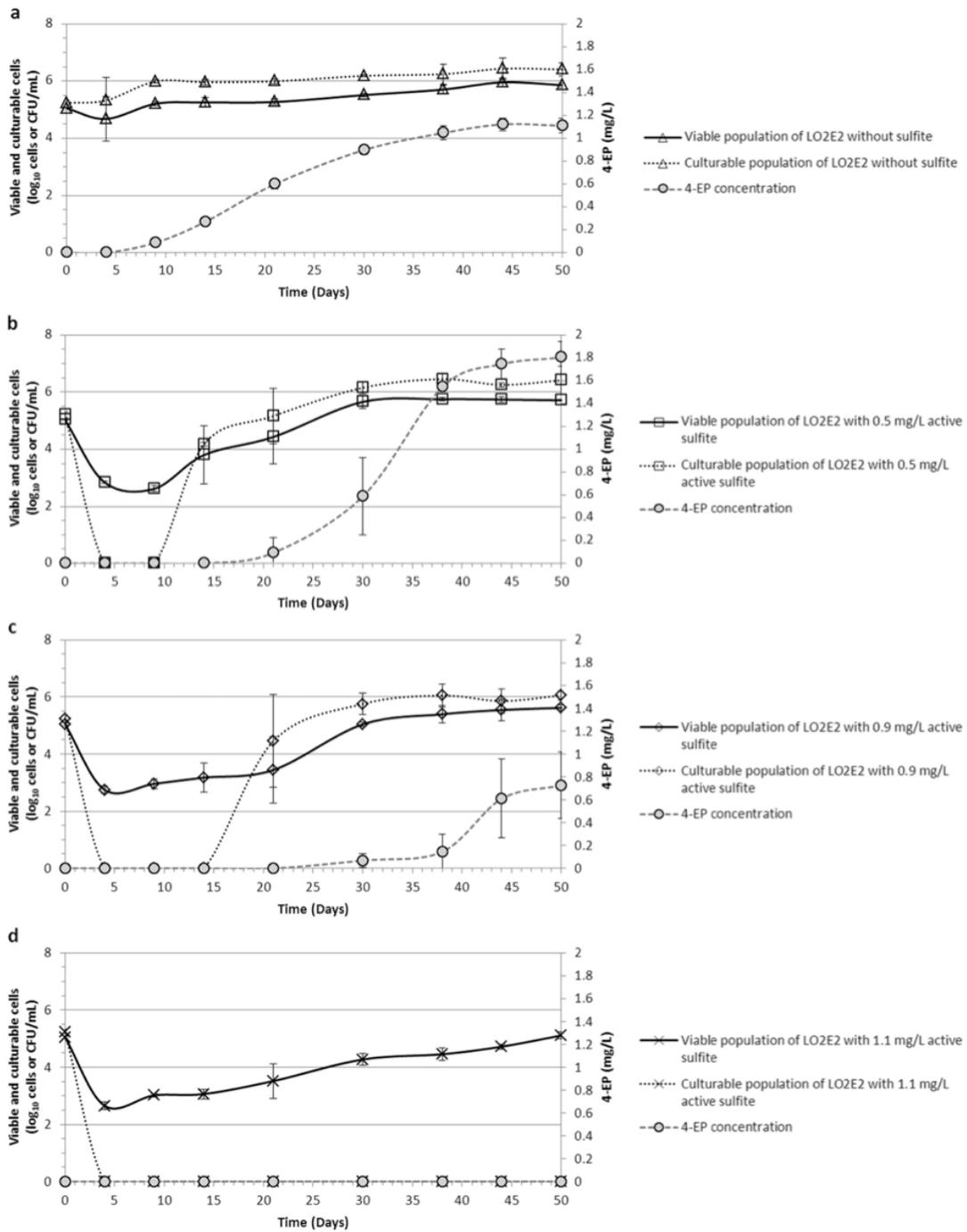


Fig. 7. Viable and culturable cells were determined after inoculation at 10⁵ cells/mL and incubated at 22 °C according to the active sulfite: 0 (a), 0.5 (b), 0.9 (c) and 1.1 (d) mg/L. Red wine was initially supplemented with 5 mg/L *p*-coumaric acid. 4-EP production was monitored by UHPLC over time. Error bars represent the standard deviations between the three independent triplicates.

B. bruxellensis growth recovery while a relatively high amount of mSO₂ was still present (>0.6 mg/L).

The growth recovery observed in our work seemed to be closely linked to the ability of cells to decrease cell membrane permeability. Indeed, the permeabilization of plasma membranes is a critical event that leads to cell death. Consequently, monitoring of *B. bruxellensis* by PI

staining gives useful physiological information. We showed here that a significant decrease of cell permeability was observed during to VBNC exit. This effect was greater with the most sulfite tolerant strain, showing that PI could be used to assess *B. bruxellensis* sulfite tolerance. This also suggests that ability to exit VBNC is partially linked to mechanisms that restore functional cell permeability.

In addition to physiological and biochemical changes, we showed that the size of the two strains of *B. bruxellensis* tested was smaller when incubated with SO₂, compared to cells incubated in red wine without SO₂. Cell size increased when cell culturability or cell viability was restored, reflecting a greater metabolic activity of *B. bruxellensis*. This result is in agreement with previous studies. Agnolucci et al. (2010) and Serpaggi et al. (2012) highlighted a smaller *B. bruxellensis* cell size when SO₂ was present in the medium. However, these cells did not undergo a decrease of their cell size but it is the cell size without sulfite which increases during the growth leading to a cell size difference between conditions.

4-EP production was monitored to know if *B. bruxellensis* in VBNC state is able to produce volatile phenols. In our study, no 4-EP production was observed during VBNC state. This result is in agreement with studies performed on red wine (Agnolucci et al., 2010; Zuehlke & Edwards, 2013) but in disagreement with the study performed by Serpaggi et al. (2012) in synthetic wine medium. We found that the higher the mSO₂ concentration, the longer the delay before ethylphenol production. Even a high population level with metabolic activity but without culturability did not lead to wine spoilage. Ethylphenol production occurred between the mid-exponential growth phase and the beginning of the stationary phase (Dias, Pereira-da-Silva, Tavares, Malfeito-Ferreira, & Loureiro, 2003).

Finally, another original aspect demonstrated in our study is that sulfite efficiency is population level dependent. To our knowledge, this is the first time that the link between *B. bruxellensis* population and mSO₂ concentration has been studied. The responses to mSO₂ were different according to the population levels tested in the present study: the higher the yeast concentration, the lower the efficiency of mSO₂. Inside the cell, mSO₂ is converted to bisulfite and sulfite anions since intracellular pH is about 5.5–6.5 (Imai & Ohno, 1995), leading to a decrease of the intracellular mSO₂ concentration. This allows more mSO₂ to enter the cell by diffusion (Divol et al., 2012). In these conditions the lower the initial population, the higher the intracellular mSO₂. Indeed, a small sulfite dose is sufficient to lead to cell death if the yeast population is low and the strains present are rather sensitive to sulfite. However, in the case of high *B. bruxellensis* density, mSO₂ might be limited to exert growth inhibition. This population effect was also demonstrated for *Zygosaccharomyces bailii*, also considered as a wine spoilage yeast. A relationship between yeast population level and sorbic acid was demonstrated: the higher the yeast concentration, the lower the efficiency of sorbic acid (Steels, James, Roberts, & Stratford, 2000).

5. Conclusions

Our study highlighted different points that will aid better management of sulfite in wine. We demonstrated here that *B. bruxellensis* can enter VBNC state in red wine but does not produce any ethylphenol in this form. Above all, under certain conditions such as lower mSO₂, *B. bruxellensis* is able to exit VBNC form and regain culturability, leading to the production of ethylphenols. PI staining allowed us to show that sulfite induces increased yeast cell permeability, which is probably an additional sulfite effect leading to cell death. PI staining experiments also emphasized that the ability of cells to restore functional cell permeability constitutes another sulfite adaptation mechanism. The existence of VBNC cells induced by sulfite in red wine shows the need to assess the level of VBNC cells in wine using flow cytometry, for example, and to maintain a certain level of mSO₂ through aging to prevent exit from VBNC. A major finding of this study is the demonstration of the relationship between the level of mSO₂ to be used and the initial *B. bruxellensis* population. This will help winemakers to reduce the sulfite level in wine, providing *B. bruxellensis* is monitored.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.019>.

Author contributions statement

Conceived and designed the experiments: HA, SR, MGB and CL. Performed the experiments: CL, CD and FJ. Generated and analyzed the data: CL, CD, FJ, HA, SR and MGB. Wrote the paper: CL, HA, SR and MGB.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Funding

This work was funded by the Regional Council of Burgundy, the Interprofessional Office of Burgundy Wines (E110CVPARI) and FranceAgriMer (GNBrett project) (7120164497).

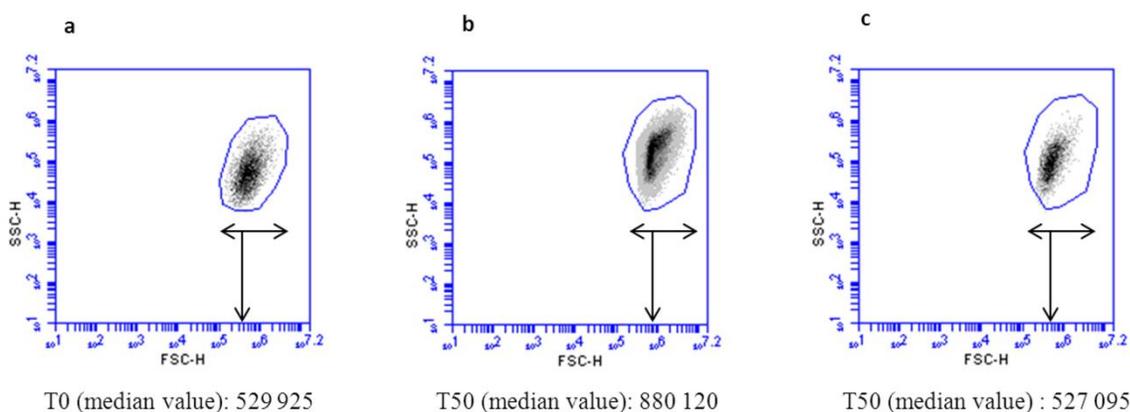
Acknowledgments

The authors would also like to thank AVRAMOVA Marta and P^r MASNEUF-POMAREDE Isabelle (Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Bordeaux) for providing the strain CRB Oeno LO417.

References

- Agnolucci, M., Rea, F., Sbrana, C., Cristani, C., Fracassetti, D., Tirelli, A., & Nuti, M. (2010). Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1), 76–80.
- Barata, A., Caldeira, J., Botelho, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2008). Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 201–207.
- Beech, F. W., & Thomas, S. (1985). Action antimicrobienne de l'anhydride sulfureux. *Bull OIV*, 58, 564–581.
- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., & Suárez-Lepe, J. a. (2009). A method for estimating *Dekkera/Brettanomyces* populations in wines. *Journal of Applied Microbiology*, 106(5), 1743–1751.
- Bouix, M., & Leveau, J. -Y. (2001). Rapid assessment of yeast viability and yeast vitality during alcoholic fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 107(4), 217–225.
- Branco, P., Viana, T., Albergaria, H., & Arneborg, N. (2015). Antimicrobial peptides (AMPs) produced by *Saccharomyces cerevisiae* induce alterations in the intracellular pH, membrane permeability and culturability of *Hanseniaspora guilliermondii* cells. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 112–118.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., & Pons, M. (1992a). The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60(2), 165–178.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., & Boidron, J. -N. (1992b). Le caractère phénolique des vins rouges: caractérisation, origine et moyens de lutte. *Revue Française d'Oenologie*, 32(138), 21–24.
- Conterno, L., Joseph, C. L., Arvik, T. J., Henick-Kling, T., & Bisson, L. F. (2006). Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(2), 139–147.
- Craig, J. T., & Heresztyn, T. (1984). 2-ethyl-3,4,5,6-tetrahydropyridine — an assessment of its possible contribution to the mousy off-flavor of wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 35(1), 46–48.
- Curtin, C., Kennedy, E., & Henschke, P. a. (2012). Genotype-dependent sulphite tolerance of Australian *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis* wine isolates. *Letters in Applied Microbiology*, 55(1), 56–61.
- Curtin, C., Varela, C., & Borneman, A. (2015). Harnessing improved understanding of *Brettanomyces bruxellensis* biology to mitigate the risk of wine spoilage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 680–692. <http://dx.doi.org/10.1111/ajgw.12200>.
- Dias, L., Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2003). Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiology*, 20(4), 377–384.
- Divol, B., & Lonvaud-Funel, A. (2005). Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), 85–93.
- Divol, B., Du Toit, M., & Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: Strategies developed by wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(3), 601–613.
- Du Toit, W. J., Pretorius, I. S., & Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), 862–871.
- Gerbaux, V., Jeudy, S., & Monamy, C. (2000). Étude des phénols volatils dans les vins de Pinot noir en Bourgogne. *Bulletin de l'OIV*, 73(835–36), 581–599.

- Grbin, P., Costello, P., Herderich, M., Markides, A., Henschke, P., & Lee, T. (1995). In C. S. Stockley (Eds.), *Developments in the sensory, chemical and microbiological basis of mousy taint in wine* (pp. 57–61) Adelaide, South Australia.
- Heresztyn, T. (1986). Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37(2), 127–132.
- Imai, T., & Ohno, T. (1995). The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10), 3604–3608.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51–63.
- Larcher, R., Nicolini, G., Puecher, C., Bertoldi, D., Moser, S., & Favaro, G. (2007). Determination of volatile phenols in wine using high-performance liquid chromatography with a coulometric array detector. *Analytica Chimica Acta*, 582(1), 55–60.
- Nicolini, G., Larcher, R., Bertoldi, D., Puecher, C., & Magno, F. (2015). Rapid quantification of 4-ethylphenol in wine using high-performance liquid chromatography with a fluorimetric detector. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 46(4), 202.
- Oelofse, A., Pretorius, I. S., & Du Toit, M. (2008). Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: A synoptic review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 29(2), 128–144.
- Peynaud, E., & Domercq, S. (1956). Sur les *Brettanomyces* isolés de raisins et de vins. *Archiv für Mikrobiologie*, 24(3), 266–280.
- Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2001). Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera*/*Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 588–599.
- Salma, M. (2013). *Etude et caractérisation de l'état "Viable mais Non Cultivable" chez Saccharomyces cerevisiae* (Doctoral thesis). Dijon: University of Burgundy.
- Salma, M., Rousseaux, S., Sequeira-Le Grand, A., & Alexandre, H. (2012). Cytofluorometric detection of wine lactic acid bacteria: Application of malolactic fermentation to the monitoring. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40(1), 63–73.
- Salma, M., Rousseaux, S., Sequeira-Le Grand, A., Divol, B., & Alexandre, H. (2013). Characterization of the viable but nonculturable (VBNC) state in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 8(10).
- Schnürer, J., & Rosswall, T. (1982). Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(6), 1256–1261.
- Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., & Alexandre, H. (2012). Characterization of the "viable but nonculturable" (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiology*, 30(2), 438–447.
- Snowdon, E. M., Bowyer, M. C., Grbin, P. R., & Bowyer, P. K. (2006). Mousy off-flavor: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6465–6474.
- Steels, H., James, S. A., Roberts, I. N., & Stratford, M. (2000). Sorbic acid resistance: The inoculum effect. *Yeast*, 16(13), 1173–1183.
- Teranishi, R., Buttery, R. G., & Guadagni, D. G. (1975). *Odor, thresholds, and molecular structure*. In *Geruch und Geschmacksstoffe Internationales Symposium*.
- Vigentini, I., Joseph, C. M. L., Picozzi, C., Foschino, R., & Bisson, L. F. (2013). Assessment of the *Brettanomyces bruxellensis* metabolome during sulphur dioxide exposure. *FEMS Yeast Research*, 13(7), 597–608.
- Zuehlke, J. M., & Edwards, C. G. (2013). Impact of sulfur dioxide and temperature on culturability and viability of *Brettanomyces bruxellensis* in wine. *Journal of Food Protection*, 76(12), 2024–2030.



Supplementary material 1

Example of determination of the median values over time allowing the ratio calculation (T_{50}/T_0). (a) shows the median value of the cell size initially inoculated, (b) shows the median size of cells at 50 days incubated in red wine without sulfite and (c) shows the median size of cells at 50 days incubated in red wine with 1.1 mg/L active sulfite. In this example, T_{50} was determined as 1.7 times larger than cells initially inoculated whereas the size of cells incubated with 1.1 mg/L mSO_2 did not change over time.

Supplementary material 2

Table shows *B. bruxellensis* populations over time determined by FCM (FDA staining) and plate counting (selective medium) according to the initial population levels and the molecular sulfite amounts (corresponding to results show in the Fig. 1c). Standard deviations represent errors between the three independent enumerations.

	Days	Without mSO ₂		0.5 mg/L mSO ₂		0.9 mg/L mSO ₂		1.1 mg/L mSO ₂	
		Viability	Culturability	Viability	Culturability	Viability	Culturability	Viability	Culturability
10 ³ cells/mL	0	3.0 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.0 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.0 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.0 ± 0.1	3.3 ± 0.1
	1	2.8 ± 0.1	3.2 ± 0.1	0.6 ± 1.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	2	2.9 ± 0.2	3.3 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	3	2.9 ± 0.1	3.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0
	4	3.1 ± 0.1	3.8 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	9	4.6 ± 0.1	5.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	14	5.2 ± 0.1	5.9 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	17	5.6 ± 0.0	6.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	21	5.7 ± 0.0	6.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	25	5.6 ± 0.1	6.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	30	5.5 ± 0.0	6.0 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	38	5.4 ± 0.1	6.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	44	5.6 ± 0.1	6.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	50	5.5 ± 0.3	6.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
10 ⁴ cells/mL	0	4.0 ± 0.0	4.2 ± 0.1	4.0 ± 0.0	4.2 ± 0.1	4.0 ± 0.0	4.2 ± 0.1	4.0 ± 0.0	4.2 ± 0.1
	1	3.8 ± 0.0	4.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	2	3.8 ± 0.0	4.3 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	3	3.8 ± 0.1	4.6 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	4	4.2 ± 0.1	4.9 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	9	5.1 ± 0.0	5.7 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	14	5.4 ± 0.2	6.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	17	5.7 ± 0.1	5.8 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	21	5.6 ± 0.1	6.3 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	25	5.5 ± 0.1	6.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	30	5.5 ± 0.2	6.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	38	5.1 ± 0.6	6.0 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	44	5.5 ± 0.1	6.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	50	5.4 ± 0.1	5.9 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
10 ⁵ cells/mL	0	5.0 ± 0.0	5.2 ± 0.1	5.0 ± 0.0	5.2 ± 0.1	5.0 ± 0.0	5.2 ± 0.1	5.0 ± 0.0	5.2 ± 0.1
	1	4.8 ± 0.1	5.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	2	4.8 ± 0.1	5.4 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	3	4.9 ± 0.1	5.6 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	4	5.1 ± 0.1	5.8 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	9	5.3 ± 0.1	6.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	14	5.3 ± 0.0	6.0 ± 0.0	2.7 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	17	5.6 ± 0.1	5.9 ± 0.1	3.4 ± 1.4	0.0 ± 0.0	3.8 ± 1.4	0.0 ± 0.0	2.8 ± 0.1	0.0 ± 0.0
	21	5.4 ± 0.4	6.3 ± 0.2	3.7 ± 1.4	0.0 ± 0.0	4.4 ± 1.6	0.0 ± 0.0	3.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0
	25	5.6 ± 0.2	6.1 ± 0.1	3.8 ± 1.7	0.0 ± 0.0	4.5 ± 1.7	3.0 ± 1.9	3.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0
	30	5.5 ± 0.1	5.7 ± 0.4	3.7 ± 1.8	4.7 ± 1.6	5.0 ± 0.8	3.7 ± 0.5	2.7 ± 0.1	0.0 ± 0.0
	38	4.9 ± 0.8	6.1 ± 0.4	4.4 ± 1.6	5.5 ± 0.6	5.5 ± 0.0	4.2 ± 0.3	3.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	44	5.4 ± 0.1	5.6 ± 0.1	4.6 ± 1.7	5.5 ± 0.0	5.6 ± 0.0	4.3 ± 0.0	2.9 ± 0.2	0.0 ± 0.0
	50	5.4 ± 0.1	5.9 ± 0.1	4.6 ± 1.7	5.8 ± 0.1	5.6 ± 0.1	4.2 ± 0.1	3.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Supplementary material 3

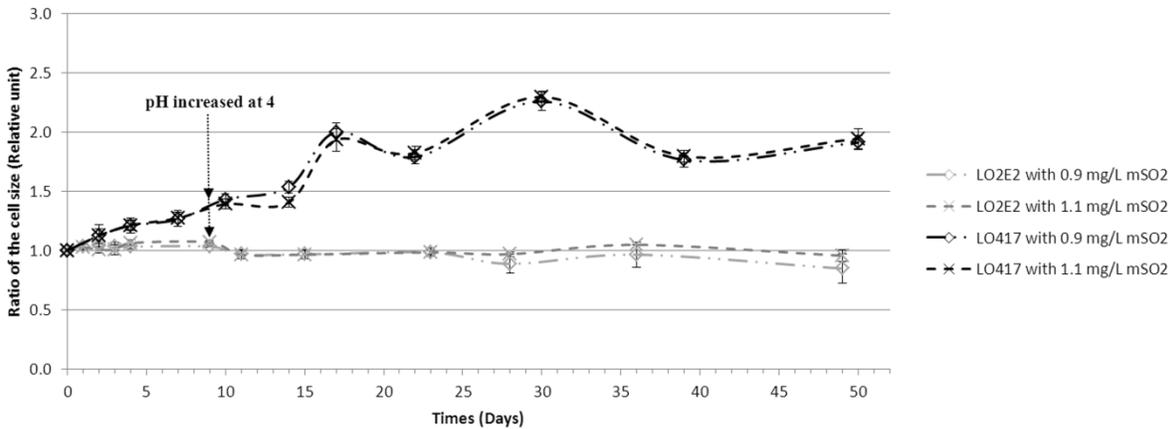
Results of Pearson correlative test thanks to XLStat® software for the two strains (LO2E2 and LO417) according to the initial population level, sulfite amount and viability (V) or culturability (C) of the cells. Bold values mean a significant correlation (*p* value <0.05) between the experiments.

a

Strain LO2E2	Without SO ₂						With 0.5 mSO ₂						With 0.9 mSO ₂						With 1.1 mSO ₂					
	10 ³ cells/mL		10 ⁴ cells/mL		10 ⁵ cells/mL		10 ³ cells/mL		10 ⁴ cells/mL		10 ⁵ cells/mL		10 ³ cells/mL		10 ⁴ cells/mL		10 ⁵ cells/mL		10 ³ cells/mL		10 ⁴ cells/mL		10 ⁵ cells/mL	
	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C
10 ³ cells/mL V	1	0.9960	0.9831	0.9701	0.8073	0.7656	1	0.9823	0.9823	0.9823	0.2772	0.3188	1	1.0000	1.0000	1.0000	0.2326	0.4658	1	0.9938	0.9938	0.9938	0.5018	0.9938
C		1	0.9821	0.9816	0.8070	0.7883		1	1.0000	1.0000	0.3455	0.3586		1	1.0000	1.0000	0.2326	0.4658		1	1.0000	1.0000	0.5342	1.0000
10 ⁴ cells/mL V			1	0.9667	0.8844	0.7707			1	1.0000	0.3455	0.3586			1	1.0000	0.2326	0.4658			1	1.0000	0.5342	1.0000
C				1	0.7889	0.8615				1	0.3455	0.3586				1	0.2326	0.4658				1	0.5342	1.0000
10 ⁵ cells/mL V					1	0.5896					1	0.7163					1	0.7914					1	0.5342
C						1						1						1						1

b

Strain LO417	Without SO ₂						With 0.5 mSO ₂						With 0.9 mSO ₂						With 1.1 mSO ₂					
	10 ³ cells/mL		10 ⁴ cells/mL		10 ⁵ cells/mL		10 ³ cells/mL		10 ⁴ cells/mL		10 ⁵ cells/mL		10 ³ cells/mL		10 ⁴ cells/mL		10 ⁵ cells/mL		10 ³ cells/mL		10 ⁴ cells/mL		10 ⁵ cells/mL	
	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C	V	C
10 ³ cells/mL V	1	0.9952	0.9939	0.9879	0.9627	0.8580	1	0.9832	0.9659	0.9472	0.9646	0.9349	1	0.9969	0.9749	0.9063	0.9697	0.9423	1	1.0000	1.0000	1.0000	0.4987	1.0000
C		1	0.9867	0.9922	0.9784	0.8952		1	0.9776	0.9668	0.9712	0.9565		1	0.9684	0.9005	0.9582	0.9320		1	1.0000	1.0000	0.4987	1.0000
10 ⁴ cells/mL V			1	0.9830	0.9478	0.8450			1	0.9915	0.9805	0.9402			1	0.9698	0.9853	0.9846			1	1.0000	0.4987	1.0000
C				1	0.9765	0.9037				1	0.9572	0.9190				1	0.9479	0.9763				1	0.4987	1.0000
10 ⁵ cells/mL V					1	0.9224					1	0.9648					1	0.9899					1	0.4987
C						1						1						1						1



Supplementary material 4

Ratio between the cell size over time (values of the median FSC (relative unit) determined by FCM) and the initial cell size of *B. bruxellensis* LO2E2 and LO417 when they were inoculated at 10⁵ cells/mL with 0.9 or 1.1 mg/L mSO₂. In this figure, pH was increased at 4 day 9. Measurements were performed over time in red wine in triplicate.

Résultats complémentaires

Dosage du SO₂

Deux méthodes de dosage du SO₂ ont été testées (la méthode officielle : méthode Franz-Paul et une méthode usuelle automatisée : méthode Ripper). Pour la méthode Ripper, la précision est estimée à 10 mg/L. Pour la méthode officielle, la répétabilité est de 1 mg/L pour une teneur totale inférieure à 50 mg/L et de 6 mg/L pour une teneur supérieure à 50 mg/L et la reproductibilité est de 9 mg/L pour une teneur totale inférieure à 50 mg/L et de 15 mg/L pour une teneur supérieure à 50 mg/L (Recueil OIV, Méthode OIV-MA-AS323-04A).

La méthode de Franz-Paul n'a pas été retenue pour deux raisons : i) longueur de l'analyse et ii) non-automatisation possible. La méthode Ripper présente une difficulté d'appréciation du virage du réactif coloré notamment en vin rouge. L'automatisation de cette méthode lève cette difficulté ; en effet, l'appareil arrête la mesure dès que l'iode se trouve en excès et donc que tout le SO₂ a été oxydé. Si le vin contient beaucoup de substances oxydables (notamment des composés phénoliques), il faut faire une correction en effectuant une mesure sur un vin désulfité chimiquement (par ajout de H₂O₂). Cette correction a été appliquée au vin utilisé ; elle a été considérée comme négligeable car la quantité d'iode utilisée pour oxyder les composés du vin autres que le SO₂ a été inférieure à 0,1 mL d'I₂ 0,01 M.

Le SO₂ libre contenu dans le vin rouge auquel ont été additionnées différentes concentrations de SO₂ total allant de 10 mg/L à 160 mg/L a été dosé par la méthode Ripper automatisée. Les résultats sont présentés dans la **Fig. 12**. Ces dosages nous ont permis d'établir une courbe de corrélation permettant d'estimer la fraction de SO₂ restant libre après ajout de la solution aqueuse de dioxyde de soufre à partir d'une solution sulfureuse à 5% (p/v).

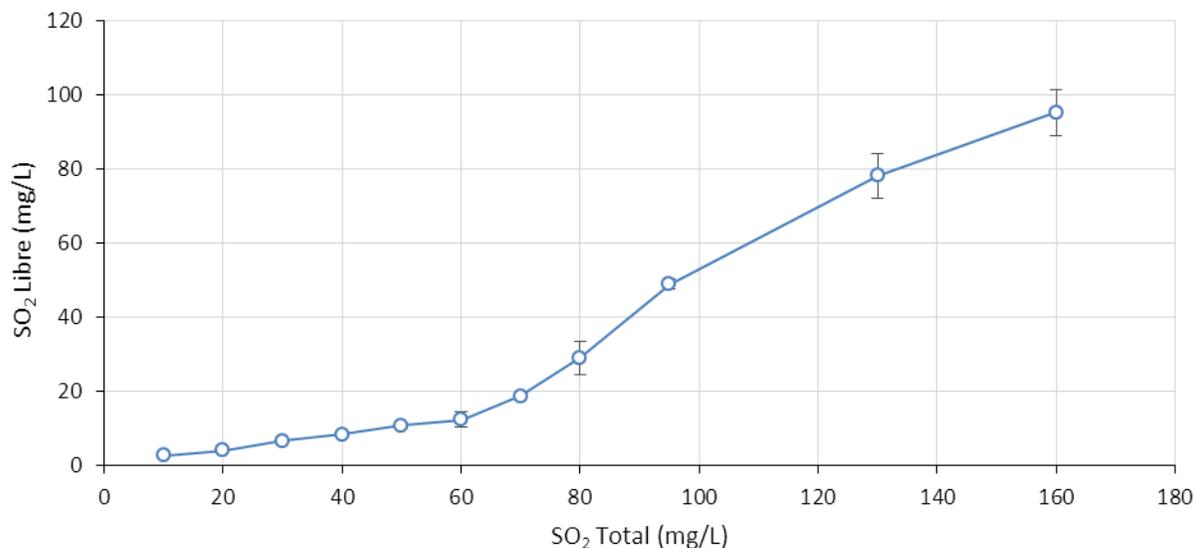


Fig. 12

Courbe de corrélation représentant le SO₂ libre en fonction du SO₂ total (de 10 à 160 mg/L) ajouté au vin rouge. Les mesures ont été réalisées par la méthode Ripper automatisée.

Une combinaison importante est mise en évidence avec les faibles quantités ajoutées de SO₂ total (**Fig. 12**). En effet, les concentrations allant de 10 mg/L à 60 mg/L présentent un ratio de SO₂ libre par rapport au SO₂ total de 1/5. Cependant, plus les concentrations en SO₂ total sont élevées, plus la fraction de SO₂ libre devient importante. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que le vin utilisé lors de cette étude n'a jamais été ou très faiblement sulfité auparavant. En effet, il faut tenir compte d'une combinaison de la dose ajoutée d'autant plus importante que la teneur en SO₂ libre est faible (Ribéreau-Gayon et al., 2012). Ces mêmes conditions ont également été analysées par un laboratoire prestataire spécialisé dans les analyses en œnologie (Terroirs et Conseils, Meursault, France). Les résultats retrouvés par celui-ci sont similaires à ceux obtenus par notre méthode.

Une nouvelle courbe de corrélation a été réalisée sur des concentrations en SO₂ total allant de 10 mg/L à 50 mg/L pour plus de précision (**Fig. 13**).

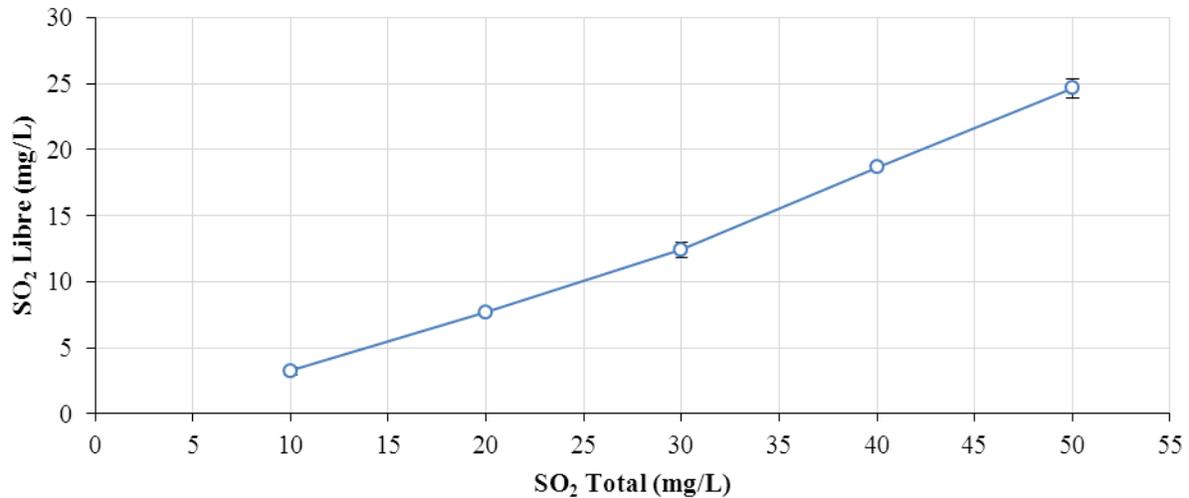


Fig. 13

Courbe de corrélation représentant le SO₂ total en fonction du SO₂ libre (de 10 à 50 mg/L) en vin rouge. Les mesures ont été réalisées par la méthode Ripper automatisée.

L'équation de cette gamme est $y = 0,5376x - 2,7895$ et peut donc être utilisée afin de déterminer la concentration de SO₂ total à ajouter à un échantillon afin d'avoir une concentration de SO₂ libre donnée. Dans nos conditions, 25, 36 et 43 mg/L de SO₂ total ont été ajoutés en vin rouge à partir d'une solution sulfureuse à 5% (p/v). Ces concentrations ont permis une mesure de 10, 16 et 20 mg/L de SO₂ libre, correspondant pour notre vin à respectivement 0,5, 0,9 et 1,1 mg/L de SO₂ moléculaire. La concentration en SO₂ libre présent a été vérifiée avant chaque expérimentation.

Pour chaque concentration, un suivi de la perte du SO₂ libre donc du SO₂ moléculaire au cours du temps a été effectué.

Conclusions

&

Perspectives

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse portaient sur la mise au point de méthodes de quantification des microorganismes d'altération du vin, principalement les bactéries acétiques et la levure *Brettanomyces bruxellensis*. À ce jour, différentes méthodes existent pour quantifier ces microorganismes. Cependant, celles-ci ne sont pas toujours adaptées à la matrice vin ou peuvent prendre plusieurs jours avant d'avoir un résultat. C'est pourquoi nous nous sommes focalisés sur les techniques de cytométrie en flux mais également sur la PCR en temps réel. Ces deux méthodes quantitatives présentent de nombreux avantages comparées à la méthode de dénombrement sur boîte de Pétri. Le principal est qu'elles fournissent un résultat de quantification des cellules après seulement 24 h à 48 h contrairement au dénombrement classique qui demande 4 à 7 jours d'incubation.

La première partie de cette thèse s'est intéressée à développer une méthode sensible et rapide afin de quantifier les BA. Pour cela, des marqueurs fluorescents, tels que l'iodure d'hexidium et une lectine fluorescente, couplés à la cytométrie en flux ont été utilisés. Après de nombreuses tentatives, aucun protocole n'a été jugé comme satisfaisant c'est-à-dire sensible, rapide et reproductible en vin rouge. Comme aucune discrimination Gram⁺ versus Gram⁻ n'a montré de résultats satisfaisants, la méthode FISH couplée à la CMF a été testée. Cependant, bien que la sonde utilisée soit spécifique des BA en milieu de culture, de nombreuses difficultés ont été mises en évidence en vin rouge et cela probablement en raison de la présence de nombreux composés phénoliques. Il faudra donc continuer les essais de désorption des polyphénols en modifiant les solutions utilisées (solution d'éthanol à 40% (v/v) par exemple) de manière à permettre une fluorescence suite à un marquage avec la sonde FISH. De plus, afin d'améliorer la spécificité de l'hybridation, d'autres cibles pourraient être utilisées comme les ARN messagers par exemple (single molecule RNA FISH)³. Instables après la mort cellulaire, ceux-ci permettraient de quantifier seulement les bactéries vivantes. Cependant, le faible nombre de transcrits d'un gène pourrait entraîner une faible fluorescence suite à une hybridation *in situ* en fluorescence, donc l'utilisation de la sonde Aceto2 couplée à une « boîte quantique » (Quantum dot) pourrait permettre d'obtenir un signal fort même si peu de sondes sont hybridées. Le principal avantage de l'utilisation des quantum dots est que ces nanoparticules peuvent être excitées à une seule longueur d'onde et émettent une fluorescence différente selon leur taille. Une

³ <http://singlemoleculefish.com/>

autre perspective envisageable serait l'utilisation de bactériophages modifiés génétiquement. En effet Vinay et al. (2015) ont montré qu'après une infection effectuée sur les bactéries cibles, il était obtenu une fluorescence des bactéries cibles (Vinay et al., 2015). Le protocole développé dans leur étude a ainsi permis la quantification des deux bactéries testées : *E. coli* et *S. enterica* après seulement deux heures d'incubation avec les bactériophages. D'après ces auteurs, il va être possible de concevoir des outils de biocapteurs spécifiques pour détecter une souche bactérienne donnée ou des détecteurs de large gamme si plusieurs phages spécifiques sont mélangés dans un même échantillon. Pour adapter cette technique aux BA, il faudra soit un bactériophage spécifique des bactéries Gram⁻ soit un bactériophage spécifique des espèces de BA. Grâce aux outils de biologie moléculaire, le bactériophage pourrait être transformé afin d'intégrer un gène codant une GFP par exemple avec un promoteur permettant une forte transcription. La mise en place d'un tel outil ainsi que le développement d'un protocole rapide et fiable peut cependant prendre beaucoup de temps puisqu'à ce jour, un seul bactériophage isolé à partir d'une bactérie du genre *Gluconobacter* est connu⁴.

Nous nous sommes ensuite dirigés vers l'utilisation de la PCR quantitative afin de permettre une quantification fiable des bactéries acétiques en vin rouge. Un protocole a été adapté afin de répondre à toutes les contraintes retrouvées en milieu vin. La méthode permet une quantification fiable, sensible et relativement rapide des BA présentes en vin rouge. La robustesse des résultats de quantification développés dans notre étude par cette méthode est issue de l'adaptation du protocole d'extraction afin d'isoler efficacement l'ADN bactérien en vin rouge ainsi que l'utilisation d'un témoin interne afin de valider l'extraction de l'ADN et son amplification par PCR. La limite de quantification a été déterminée en vin rouge comme étant inférieure à 10³ cellules/mL si la prise d'essai est de 10 mL.

Cependant, en œnologie, de nombreux intrants chimiques conduisent à la mort cellulaire dont le principal utilisé par les vignerons est le dioxyde de soufre. Il est maintenant connu que l'utilisation de cette méthode de quantification peut entraîner une erreur par la présence de microorganismes morts dans le milieu. Donc, un suivi régulier des vins en fûts lors du vieillissement est la seule solution afin de pouvoir constater une possible augmentation de la

⁴ <http://www.phage.ulaval.ca/?pageDemandee=phage&noPhage=201&id=41&L=1>

population des BA. Sinon, la solution la plus utilisée dans la littérature afin de quantifier que les microorganismes vivants par qPCR est d'utiliser du propidium monoazide (PMA). Après son entrée dans les cellules mortes, le PMA se fixe à l'ADN inhibant ensuite toutes quantifications. Cependant, la présence d'éthanol en vin entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire. Cette dernière peut entraîner l'entrée du PMA à l'intérieur de la cellule alors que celles-ci n'est pas morte. Cela peut donc conduire à une sous-estimation de la population vivante. Un protocole d'adaptation a été développé afin de que les microorganismes vivants présents dans le vin retrouvent une intégrité membranaire totale évitant l'entrée du PMA. Ce protocole d'adaptation cellulaire pourrait alors être mis en place avant de quantifier les BA en vin rouge avec la méthode développée dans cette étude. La seconde possibilité est de changer de cibles PCR (ARN au lieu de l'ADN). Après extraction des ARN totaux, un protocole de retro-transcription pourrait alors être effectué avec des amorces spécifiques ciblant des gènes de référence (gène de ménage) spécifiques des bactéries acétiques. Cependant, Vandecasteele et al. (2001) ont montré que le niveau d'expression de ces gènes varie selon les différents stades de croissance bactérienne. Quintero et al. (2009) ont mis en évidence que seuls les gènes codant pour les ARN ribosomiques sont adéquates pour ces études.

La seconde partie de cette thèse s'est intéressée à la levure d'altération *Brettanomyces bruxellensis*. Toutes les études menées sur cette levure d'altération lors de cette thèse font partie intégrante d'un projet national GNBrett, rassemblant de nombreux laboratoires publics comme privés. Ce groupe de travail a été développé afin d'enrichir les connaissances actuelles sur cette levure d'un point de vue génétique et physiologique mais également pour améliorer les méthodes de quantification de cette levure en milieu vin.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à améliorer le protocole FISH couplé à la CMF déjà existant afin d'obtenir un résultat de quantification plus rapide mais toujours aussi efficace. Pour cela, une désorption des polyphénols adsorbés au niveau de la paroi des levures est réalisée par le lavage des cellules avec une solution d'éthanol. Cette dernière permet également une fixation ainsi qu'une perméabilisation des cellules qui seront ensuite hybridées avec la sonde spécifique existante. De plus, il a été démontré que cette méthode était très spécifique avec une sensibilité suffisante afin de détecter les cellules avant toutes altérations du vin. Concernant la

quantification par CMF, suite à de nombreuses expérimentations, un résultat est maintenant disponible en 18 h comparé aux 48 h nécessaire précédemment. Cependant, cette méthode permet une quantification globale de la population de *B. bruxellensis* en vin rouge puisqu'il a été démontré que les levures mortes étaient quantifiées. Des tests avec l'utilisation du fluorochrome PI (marquant seulement les cellules dites mortes) ont alors été menés. Après incubation, aucune différence de fluorescence entre les cellules mortes et les cellules vivantes n'a pu être évaluée. Les principales hypothèses de ces résultats sont que le fluorochrome PI devient instable durant l'hybridation de la sonde (56°C durant 16 h) ou que celui-ci ressort des cellules. La première hypothèse est la plus plausible. De plus, comme la désorption des polyphénols est réalisée avec une solution d'éthanol, le marquage avec le PI ne peut pas s'effectuer après ceux-ci du fait de l'augmentation de la perméabilité membranaire des cellules. Donc, afin de quantifier seulement la population vivante de *B. bruxellensis*, il serait intéressant de continuer les expérimentations dans cette voie, c'est-à-dire faire un double marquage (cellules vivantes : simplement marquées ; cellules mortes : doublement marquées). Des dénombrements sur milieu gélosé devront toujours être mis en place afin de vérifier les résultats obtenus par CMF.

Dans un deuxième temps, un des objectifs de cette thèse a été de tester et comparer différents kits commerciaux permettant l'extraction de l'ADN de *B. bruxellensis* ainsi que son amplification. La répétabilité et la reproductibilité de kits commerciaux quantifiant cette levure en vin par qPCR ont été analysées par trois laboratoires dont VALMiS. Ceux-ci permettent une quantification de cette levure en matrice vinaire. Trois d'entre eux ont été sélectionnés afin de réaliser l'étude interlaboratoires. L'analyse de ces kits s'est portée sur trois vins issus de trois régions viticoles différentes, contaminés artificiellement à quatre niveaux de populations en *B. bruxellensis*. De plus, 10 vins naturellement contaminés ont été testés. Les quantifications ont été effectuées en triplicat. Le principal résultat de cette étude est qu'aucun de ces trois kits ne s'est montré à la hauteur des espérances que les fournisseurs peuvent avoir envers ceux-ci. Des surestimations ainsi que des sous-estimations ont été mises en évidence lorsque les résultats sont comparés à la méthode de référence, c'est-à-dire un dénombrement sur boîtes de Pétri. De plus, n'utilisant pas d'inhibiteur d'amplification pour les cellules mortes, ces dernières sont dénombrées. Donc ces kits ne peuvent pas donner de résultats fiables sur des vins ayant été sulfités par exemple. Afin de contourner ce problème, le monoazide de (PMA) pourrait être utilisé comme présenté

précédemment. De plus, comme ces kits n'utilisent pas de contrôle interne quantitatif, la perte d'ADN lors de l'extraction ou l'inhibition partielle de la PCR ne peut pas être mise en évidence. Il serait donc important d'ajouter un contrôle de quantification microbiologique tel que l'a fait Tessonnière et al. (2009). Le projet GNBrett est entré dans sa 3^{ème} année au mois de septembre 2016. Un axe du projet GNBrett est prévu suite à la 3^{ème} année afin de diffuser ces informations et de sensibiliser les personnes utilisant ces kits au sein des laboratoires.

Dans un troisième temps, une étude originale portant sur la résistance au stress sulfite de deux souches de *Brettanomyces* inoculées à différents niveaux de population initiaux a été menée. Le principal objectif était d'évaluer l'impact de la concentration levurienne sur la résistance de celle-ci au stress SO₂. De plus, comme les articles retrouvés dans la littérature sont divergents au sujet de la production de 4-éthylphénol (4-EP) lorsque *B. bruxellensis* est en état VNC, des expérimentations ont été menées afin de tester cela en vin rouge.

Les expérimentations menées lors de cette étude ont tout d'abord validé que la résistance au SO₂ est souche dépendante et qu'en présence de SO₂, la taille des levures est inférieure à celles inoculées sans SO₂. De plus, il a été démontré qu'une population initiale de 10⁵ cellules/mL entraînait une résistance accrue, avec une ressortie des cellules de l'état VNC plus rapide ou avec une cultivabilité retrouvée plus rapidement comparée aux expérimentations réalisées avec initialement 10³ et 10⁴ cellules/mL. Donc, une adaptation du traitement SO₂ peut être faite selon la population contaminante. Connaissant ces résultats, il serait maintenant intéressant d'étudier la diversité de cette levure à la cave et cela sur différents millésimes afin de déterminer si une ou plusieurs souches opèrent, souches pouvant être plus ou moins sensibles au sulfite, dans une même cave lors de la vinification, du vieillissement du vin ou en bouteille. Si une seule souche est présente et récurrente dans une cave, cela permettrait de personnaliser le traitement après avoir caractérisé la résistance au SO₂ de la souche retrouvée.

De plus, cette dernière étude a permis enfin de montrer que *B. bruxellensis* était incapable de produire des quantités de 4-EP susceptibles de marquer négativement le vin lorsqu'elle se trouvait dans le vin en état VNC. Cet état arrive souvent en vin dû principalement au stress SO₂ mais également à l'éthanol. Donc la non détection de 4-EP après presque 2 mois d'incubation de cette levure en état VNC en vin rouge enrichi en acide *p*-coumarique est très positive. Soit la production est impossible par les cellules en VNC soit la production est tellement faible qu'il

n'est pas possible de la quantifier avec la méthode d'analyse utilisée. Dans les deux cas, les teneurs sont très inférieures au seuil de perception de cette molécule couramment admis, c'est-à-dire 0,6 mg/L en vin rouge (Chatonnet et al., 1992a).

Références
bibliographiques

- Adam, G., et Duncan, H. (2001). Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol. Biochem.* 33, 943–951.
- Adams, M. R., et Moss, M. O. (2000). *Food Microbiology*. Royal Society of Chemistry.
- Agnolucci, M., Cristani, C., Maggini, S., Rea, F., Cossu, A., Tirelli, A., et al. (2014). Impact of sulphur dioxide on the viability, culturability, and volatile phenol production of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Ann. Microbiol.* 64, 653–659.
- Agnolucci, M., Rea, F., Sbrana, C., Cristani, C., Fracassetti, D., Tirelli, A., et al. (2010). Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *Int. J. Food Microbiol.* 143, 76–80.
- Agnolucci, M., Scarano, S., Rea, F., Toffanin, A., and Nuti, M. (2007). Detection of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* in pressed sangiovese grapes by real time PCR. *Ital. J. Food Sci.* 19, 153–164.
- Agnolucci, M., Vigentini, I., Capurso, G., Merico, A., Tirelli, A., Compagno, C., et al. (2009). Genetic diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Tuscan Sangiovese wines. *Int. J. Food Microbiol.* 130, 238–244.
- Aguilar-Uscanga, M. G. A., Delia, M.-L., et Strehaiano, P. (2000). Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: Growth and physiology in batch and chemostat cultures. *Can. J. Microbiol.* 46, 1046–1050.
- Aguilar-Uscanga, M. G. A., Délia, M.-L., et Strehaiano, P. (2003). *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 157–162.
- Albertin, W., Panfili, A., Miot-Sertier, C., Goulielmakis, A., Delcamp, A., Salin, F., et al. (2014). Development of microsatellite markers for the rapid and reliable genotyping of *Brettanomyces bruxellensis* at strain level. *Food Microbiol.* 42, 188–195.
- Alexandre, H., Granvalet, C., Guilloux-Benatier, M., Remize, F., et Tourdot-Marechal, R. (2008). *Les bactéries lactiques en oenologie; Connaissances actuelles*. Lavoisier.
- Alexandre, H., Rousseaux, I., et Charpentier, C. (1994). Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol. Lett.* 124, 17–22.
- Alvarez, B., et Martínez-Drets, G. (1995). Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. *Can. J. Microbiol.* 41, 918–924.
- Ameyama, M., et Kondô, K. (1967). Carbohydrate metabolism by the acetic acid bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 31, 724–737.

- Amiali, M., Ngadi, M. O., Smith, J. P., et Raghavan, G. S. V. (2007). Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg yolk. *J. Food Eng.* 79, 689–694.
- Amor, K. B., Breeuwer, P., Verbaarschot, P., Rombouts, F. M., Akkermans, A. D. L., Vos, W. M. D., et al. (2002). Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead bifidobacterium cells during bile salt stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5209–5216.
- Anacleto, J., et van Uden, N. (1982). Kinetics and activation energetics of death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by sulfur dioxide. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 2477–2486.
- Andorrà, I., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J. M., et Mas, A. (2010). Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 257–262.
- Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J. M., et Esteve-Zarzoso, B. (2008). Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiol.* 25, 849–856.
- Andorra, I., Monteiro, M., Esteve-Zarzoso, B., Albergaria, H., et Mas, A. (2011). Analysis and direct quantification of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* populations during alcoholic fermentation by fluorescence *in situ* hybridization, flow cytometry and quantitative PCR. *Food Microbiol.* 28, 1483–1491.
- Andrés-Barrao, C., Benagli, C., Chappuis, M., Ortega Pérez, R., Tonolla, M., et Barja, F. (2013). Rapid identification of acetic acid bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 75–81.
- Arvik, T., Conterno, L., et Henick-Kling, T. (2002). *Brettanomyces bruxellensis* in New York State wines: a global issue. Henick-Klink, T. (eds).
- Ausubel, F. M., Brent, R., Robert E. Kingston, Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., et al. (1992). *Short protocols in molecular biology*. Second edition. London: John Wiley & Sons Inc.
- Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I. M., Cantero-Moreno, D., Barja, F., et García-García, I. (2006). Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. *Process Biochem.* 41, 1160–1164.
- Bagalkot, V., Zhang, L., Levy-Nissenbaum, E., Jon, S., Kantoff, P. W., Langer, R., et al. (2007). Quantum dot–aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer. *Nano Lett.* 7, 3065–3070.
- Bağder-Elmacı, S. B., Gülgör, G., Tokatlı, M., Erten, H., İşci, A., et Özçelik, F. (2015). Effectiveness of chitosan against wine-related microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 107, 675–686.

- Barata, A., Caldeira, J., Botelho, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M., et Loureiro, V. (2008). Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 201–207.
- Barbe, J.-C., De Revel, G., Joyeux, A., Bertrand, A., et Lonvaud-Funel, A. (2001). Role of botrytized grape micro-organisms in SO₂ binding phenomena. *J. Appl. Microbiol.* 90, 34–42.
- Barbe, J.-C., de Revel, G., Joyeux, A., Lonvaud-Funel, A., et Bertrand, A. (2000). Role of carbonyl compounds in SO₂ binding phenomena in musts and wines from Botrytized grapes. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3413–3419.
- Barbin, P. (2006). *Contrôle et éléments de maîtrise de la contamination par la levure Brettanomyces au cours du procédé de vinification en rouge*. PhD Thesis, INP Toulouse, Fr.
- Barnett, J. A., Payne, R. W., et Yarrow, D. (2000). *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Barthelmebs, L., Diviés, C., et Cavin, J.F. (2001). Molecular characterization of the phenolic acid metabolism in the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum*. *Le Lait* 81, 161–171.
- Bartowsky, E. J., et Henschke, P. A. (2008). Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine—A review. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 60–70.
- Bartowsky, E. J., Xia, D., Gibson, R. L., Fleet, G. H., et Henschke, P. A. (2003). Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 307–314.
- Beech, F. W., et Tomas, S. (1985). Action antimicrobienne de l'anhydride sulfureux. *Bull OIV* 58, 564–581.
- Belly, R. T., et Claus, G. W. (1972). Effect of amino acids on the growth of *Acetobacter suboxydans*. *Arch. Für Mikrobiol.* 83, 237–245.
- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., et Suárez-Lepe, J. a. (2009). A method for estimating *Dekkera/Brettanomyces* populations in wines. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1743–1751.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogeny I.: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62, 293.
- Biegala, I. C., Not, F., Vaultot, D., et Simon, N. (2003). Quantitative assessment of Picoeukaryotes in the natural environment by using taxon-specific oligonucleotide probes in association with tyramide signal amplification-fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5519–5529.
- Bisson, L. F. (1999). Stuck and Sluggish Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, 107–119.

- Blasco, L., Ferrer, S., et Pardo, I. (2003). Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for in situ identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 225, 115–123.
- Bleve, G., Rizzotti, L., Dellaglio, F., et Torriani, S. (2003). Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4116–4122.
- Blomqvist, J. (2011). *Dekkera bruxellensis* - a competitive yeast for ethanol production from conventional and non-conventional substrates. PhD Thesis, Dept. of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences, Swedish.
- Blomqvist, J., Eberhard, T., Schnürer, J., et Passoth, V. (2010). Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1487–1497.
- Blomqvist, J., Nogué, V. S., Gorwa-Grauslund, M., et Passoth, V. (2012). Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen-limited or anaerobic conditions. *Yeast* 29, 265–274.
- Borneman, A. R., Zeppel, R., Chambers, P. J., et Curtin, C. D. (2014). Insights into the *Dekkera bruxellensis* genomic landscape: comparative genomics reveals variations in ploidy and nutrient utilisation potential amongst wine isolates. *PLOS Genet* 10, e1004161.
- Boubetra, A., Nestour, F. L., Allaert, C., et Feinberg, M. (2011). Validation of alternative methods for the analysis of drinking water and their application to *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3360–3367.
- Bouchez, J. C., Cornu, M., Danzart, M., Leveau, J. Y., Duchiron, F., et Bouix, M. (2004). Physiological significance of the cytometric distribution of fluorescent yeasts after viability staining. *Biotechnol. Bioeng.* 86, 520–530.
- Bouix, M., et Ghorbal, S. (2013). Rapid enumeration of *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation by flow cytometry. *J. Appl. Microbiol.* 114, 1075–1081.
- Bouix, M., et Ghorbal, S. (2015). Rapid assessment of *Oenococcus oeni* activity by measuring intracellular pH and membrane potential by flow cytometry, and its application to the more effective control of malolactic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 193, 139–146.
- Bouix, M., et Leveau, J.-Y. (2001). Rapid assessment of yeast viability and yeast vitality during alcoholic fermentation. *J. Inst. Brew.* 107, 217–225.
- Boyd, A. R., Gunasekera, T. S., Attfield, P. V., Simic, K., Vincent, S. F., et Veal, D. A. (2003). A flow-cytometric method for determination of yeast viability and cell number in a brewery. *FEMS Yeast Res.* 3, 11–16.
- Branco, P., Francisco, D., Chambon, C., Hébraud, M., Arneborg, N., Almeida, M. G., et al. (2013). Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by

- Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1–11.
- Branco, P., Monteiro, M., Moura, P., et Albergaria, H. (2012). Survival rate of wine-related yeasts during alcoholic fermentation assessed by direct live/dead staining combined with fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Food Microbiol.* 158, 49–57.
- Branco, P., Viana, T., Albergaria, H., et Arneborg, N. (2015). Antimicrobial peptides (AMPs) produced by *Saccharomyces cerevisiae* induce alterations in the intracellular pH, membrane permeability and culturability of *Hanseniaspora guilliermondii* cells. *Int. J. Food Microbiol.* 205, 112–118
- Brandam, C., Castro-Martínez, C., Délia, M.-L., Ramón-Portugal, F., et Strehaiano, P. (2008). Effect of temperature on *Brettanomyces bruxellensis*: metabolic and kinetic aspects. *Can. J. Microbiol.* 54, 11–18.
- Bruetschy, A., Laurent, M., et Jacquet, R. (1994). Use of flow cytometry in oenology to analyse yeasts. *Lett. Appl. Microbiol.* 18, 343–345.
- Calderón-Miranda, M. L., Barbosa-Cánovas, G. V., et Swanson, B. G. (1999). Inactivation of *Listeria innocua* in skim milk by pulsed electric fields and nisin. *Int. J. Food Microbiol.* 51, 19–30.
- Camu, N., Winter, T. D., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., et al. (2007). Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1809–1824.
- Cantacuzene, N. O., Dormedy, E. S., Smilanick, J. L., Fugelsang, K. C., Wample, R. L., Bacon, D. J., et al. (2003). Treating *Brettanomyces* in oak cubes with gaseous and aqueous ozone. in *ASEV 54th annual meeting, Reno, Nevada*.
- Carr, J. G., et Passmore, S. M. (1979). Methods for identifying acetic acid bacteria. *Soc Appl Bacteriol Tech Ser* 14, 33–45.
- Cavin, J. F., Schmitt, P., Arias, A., Lin, J., et Divies, C. (1988). Plasmid profiles in *Leuconostoc* species. *Microbiol Aliment Nutr* 6, 55–62.
- Cecchini, F., Manzano, M., Mandabi, Y., Perelman, E., et Marks, R. S. (2012). Chemiluminescent DNA optical fibre sensor for *Brettanomyces bruxellensis* detection. *J. Biotechnol.* 157, 25–30.
- Chaillet, L., Martin, G., et Genty, V. (2014). *Mise au point d'une méthode de détection des Brettanomyces par immunocytométrie*. Poster, AFC, Fr
- Chaney, D., Rodriguez, S., Fugelsang, K., et Thornton, R. (2006). Managing high-density commercial scale wine fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 100, 689–698.

- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., et Boidron, J. N. (1995). The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46, 463–468.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., et Pons, M. (1992a). The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60, 165–178.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., et Boidron, J.-N. (1992b). Le caractère phénolé des vins rouges : caractérisation, origine et moyens de lutte. *Rev. Fr. Oenologie* 32, 21–24.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., et Lavigne, V. (1993). Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *J. Sci. Food Agric.* 62, 191–202.
- Chatonnet, P., Viala, C., et Dubourdieu, D. (1997). Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 443–448.
- Chern, E. C., Siefiring, S., Paar, J., Doolittle, M., et Haugland, R. A. (2011). Comparison of quantitative PCR assays for *Escherichia coli* targeting ribosomal RNA and single copy genes. *Lett. Appl. Microbiol.* 52, 298–306.
- Chescheir, S., Philbin, D., et Osborne, J. P. (2015). Impact of *Oenococcus oeni* on wine hydroxycinnamic acids and volatile phenol production by *Brettanomyces bruxellensis*. *Am. J. Enol. Vitic.*,
- Childs, B. C., Bohlscheid, J. C., et Edwards, C. G. (2015). Impact of available nitrogen and sugar concentration in musts on alcoholic fermentation and subsequent wine spoilage by *Brettanomyces bruxellensis*. *Food Microbiol.* 46, 604–609.
- Ciani, M., et Ferraro, L. (1997). Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. *J. Sci. Food Agric.* 75, 489–495.
- Cleenwerck, I., et De Vos, P. (2008). Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: An overview of the currently applied methodology. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 2–14.
- Cleenwerck, I., Wachter, M. D., González, Á., Vuyst, L. D., et Vos, P. D. (2009). Differentiation of species of the family *Acetobacteraceae* by AFLP DNA fingerprinting: *Gluconacetobacter kombuchae* is a later heterotypic synonym of *Gluconacetobacter hansenii*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1771–1786.
- Cocolin, L., et Rantsiou, K. (2012). Quantitative polymerase chain reaction in food microbiology. *Quant. Real-Time PCR Appl. Microbiol. Caister Acad. Press Norfolk UK*, 149.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Zironi, R., et Comi, G. (2004). Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalous* in spoiled wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1347–1355.
- Coggan, M. (2003). Ozone in Wineries. *Scribd*.

- Comitini, F., De, J. I., Pepe, L., Mannazzu, I., et Ciani, M. (2004). *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 235–240.
- Conterno, L., Aprea, E., Franceschi, P., Viola, R., et Vrhovsek, U. (2013). Overview of *Dekkera bruxellensis* behaviour in an ethanol-rich environment using untargeted and targeted metabolomic approaches. *Food Res. Int.* 51, 670–678.
- Conterno, L., Joseph, C. L., Arvik, T. J., Henick-Kling, T., et Bisson, L. F. (2006). Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 139–147.
- Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., et Loureiro, V. (2008). Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiol.* 25, 422–427.
- Coulter, A., Robinson, E., Cowey, G., Francis, I. L., Lattey, K., Capone, D., et al. (2003). *Dekkera/Brettanomyces* yeast—an overview of recent AWRI investigations and some recommendations for its control. in *Grapegrowing at the Edge; Managing the Wine Business; Impacts on Wine Flavour—Proceedings of a seminar held*, 41–50.
- Couto, J. a., Barbosa, A., et Hogg, T. (2005). A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 505–510.
- Cozic, M. (1933). *Étude biochimique de bacterium xylinum...* Libr. générale de l'enseignement.
- Craig, J. T., et Heresztyn, T. (1984). 2-Ethyl-3,4,5,6-Tetrahydropyridine- an assessment of its possible contribution to the mousy off-flavor of wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 35, 46–48.
- Crauwels, S., Assche, A. V., Jonge, R. de, Borneman, A. R., Verreth, C., Troels, P., et al. (2015). Comparative phenomics and targeted use of genomics reveals variation in carbon and nitrogen assimilation among different *Brettanomyces bruxellensis* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1–12.
- Curtin, C. D., Bellon, J. R., Henschke, P. A., Godden, P. W., et Lopes, M. A. de B. (2007). Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries. *FEMS Yeast Res.* 7, 471–481.
- Curtin, C., Kennedy, E., et Henschke, P. a. (2012). Genotype-dependent sulphite tolerance of Australian *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis* wine isolates. *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 56–61.
- Curtin, C., Varela, C., et Borneman, A. (2015). Harnessing improved understanding of *Brettanomyces bruxellensis* biology to mitigate the risk of wine spoilage. *Aust. J. Grape Wine Res.* 21, 680–692.

- Da Silveira, M. G. da, Romão, M. V. S., Loureiro-Dias, M. C., Rombouts, F. M., et Abee, T. (2002). Flow Cytometric assessment of membrane integrity of ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 6087–6093.
- Dabbousi, B. O., Bawendi, M. G., Onitsuka, O., et Rubner, M. F. (1995). Electroluminescence from CdSe quantum-dot/polymer composites. *Appl. Phys. Lett.* 66, 1316–1318.
- Davey, H. M., et Hexley, P. (2011). Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. *Environ. Microbiol.* 13, 163–171.
- Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T. H., et Fleet, G. H. (1985). Practical implications of malolactic fermentation: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 290–301.
- de Barros Pita, W., Silva, D. C., Simões, D. A., Passoth, V., et Jr, M. A. de M. (2013). Physiology and gene expression profiles of *Dekkera bruxellensis* in response to carbon and nitrogen availability. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104, 855–868.
- De Deken, R. H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Microbiology* 44, 149–156.
- De Ley, J., et Schell, J. (1959). Oxidation of several substrates by *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.* 77, 445–451.
- De Ley, J., Gillis, M., et Swings, J. (1984). Family VI. *Acetobacteraceae*. *Bergey's Man. Syst. Bacteriol.* 1, 267–278.
- De Vero, L., et Giudici, P. (2008). Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 96–101.
- De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S., et Giudici, P. (2006). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiol.* 23, 809–813.
- De Vuyst, L., Camu, N., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., Van de Perre, V., Vancanneyt, M., et al. (2008). Validation of the (GTG) 5-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 79–90.
- Delaherche, A., Claisse, O., et Lonvaud-Funel, A. (2004). Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and “ropy” *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* 97, 910–915.
- Delfini, C., Gaia, P., Schellino, R., Strano, M., Pagliara, A., et Ambrò, S. (2002). Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). *J. Agric. Food Chem.* 50, 5605–5611.

- Dellaglio, F., Cleenwerck, I., Felis, G. E., Engelbeen, K., Janssens, D., et Marzotto, M. (2005). Description of *Gluconacetobacter swingsii* sp. nov. and *Gluconacetobacter rhaeticus* sp. nov., isolated from Italian apple fruit. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 2365–2370.
- Delobel, P., Pradal, M., Blondin, B., et Tesniere, C. (2012). A “fragile cell” sub-population revealed during cytometric assessment of *Saccharomyces cerevisiae* viability in lipid-limited alcoholic fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 338–344.
- Demeke, T., et Jenkins, G. R. (2009). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 1977–1990.
- Diaper, J. p., et Edwards, C. (1994). The use of fluorogenic esters to detect viable bacteria by flow cytometry. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 221–228.
- Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M., et al. (2003). Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiol.* 20, 567–574.
- Díaz, M., Herrero, M., García, L. A., et Quirós, C. (2010). Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochem. Eng. J.* 48, 385–407.
- Dickinson, J. R. (1996). Fuse1 alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeasts. *Microbiology* 142, 1391–1397.
- Divol, B., et Lonvaud-Funel, A. (2005). Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *J. Appl. Microbiol.* 99, 85–93.
- Divol, B., Du Toit, M., et Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 601–613.
- Drysdale, G. S., et Fleet, G. H. (1985). Acetic acid bacteria in some Australian wines. *Food Technol. Aust.* 37, 17–20.
- Drysdale, G. S., et Fleet, G. H. (1989). The growth and survival of acetic acid bacteria in wines at different concentrations of oxygen. *Am. J. Enol. Vitic.* 40, 99–105.
- Du Toit, W. du, Lisjak, K., Marais, J., et du Toit, M. du (2006). The effect of micro-oxygenation on the phenolic composition, quality and aerobic wine-spoilage microorganisms of different South African red wines. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 27, 57.
- Du Toit, W. J., et Lambrechts, M. G. (2002). The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 57–64.
- Du Toit, W. J., Pretorius, I. S., et Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J. Appl. Microbiol.* 98, 862–871.

- Duan, N., Wu, S., Yu, Y., Ma, X., Xia, Y., Chen, X., et al. (2013). A dual-color flow cytometry protocol for the simultaneous detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella typhimurium* using aptamer conjugated quantum dots as labels. *Anal. Chim. Acta* 804, 151–158.
- Dugelay, I., Gunata, Z., Sapis, J. C., Baumes, R., et Bayonove, C. (1993). Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. *J. Agric. Food Chem.* 41, 2092–2096.
- Dupont, S., Beney, L., Ferreira, T., et Gervais, P. (2011). Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1808, 1520–1528.
- Dupuy, P., et Maugenet, J. (1963). Métabolisme de l'acid lactique par *Acetobacter rancens*. *Ann Technol Agric* 12, 5–14.
- Edlin, D. A. N., Narbad, A., Dickinson, J. R., et Lloyd, D. (1995). The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 125, 311–315.
- Eglinton, J. M., et Henschke, P. A. (1999a). Restarting incomplete fermentations: the effect of high concentrations of acetic acid. *Aust. J. Grape Wine Res.* 5, 71–78.
- Eglinton, J. M., et Henschke, P. A. (1999b). The occurrence of volatile acidity in Australian wines. *Aust. N. Z. Grapegrow. Winemak.* 426a, 7–14.
- Ellington, A. D., et Szostak, J. W. (1990). *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818–822.
- Enrique, M., Marcos, J. F., Yuste, M., Martínez, M., Vallés, S., et Manzanares, P. (2008). Inhibition of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* by bovine lactoferrin-derived peptides. *Int. J. Food Microbiol.* 127, 229–234.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., et Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 329–337.
- Farthing, J. B., Rodriguez, S. B., et Thornton, R. J. (2007). Flow cytometric analysis of *Saccharomyces cerevisiae* populations in high-sugar Chardonnay fermentations. *J. Sci. Food Agric.* 87, 527–533.
- Fernandes, R. L., Carlquist, M., Lundin, L., Heins, A.-L., Dutta, A., Sørensen, S. J., et al. (2013). Cell mass and cell cycle dynamics of an asynchronous budding yeast population: Experimental observations, flow cytometry data analysis, and multi-scale modeling. *Biotechnol. Bioeng.* 110, 812–826.

- Ferreira, D., Moreira, D., Costa, E. M., Silva, S., Pintado, M. M., et Couto, J. A. (2013). The antimicrobial action of chitosan against the wine spoilage yeast *Brettanomyces/Dekkera*. *J. Chitin Chitosan Sci.* 1, 240–245.
- Fleet, G. H. (1993). *Wine microbiology and biotechnology*. CRC Press.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 11–22.
- Flikweert, M. T., van der Zanden, L., Janssen, W. M., Steensma, H. Y., van Dijken, J. P., et Pronk, J. T. (1996). Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast* 12 3 247-257.
- Forster, S., Snape, J. R., Lappin-Scott, H. M., et Porter, J. (2002). Simultaneous fluorescent Gram staining and activity assessment of activated sludge bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4772–4779.
- Francis, I. L., et Newton, J. L. (2005). Determining wine aroma from compositional data. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 114–126.
- Franke-Whittle, I. H., O’Shea, M. G., Leonard, G. J., et Sly, L. I. (2005). Design, development, and use of molecular primers and probes for the detection of *Gluconacetobacter* species in the pink sugarcane mealybug. *Microb. Ecol.* 50, 128–139.
- Fuchs, P., Weichel, W., Dübel, S., Breitling, F., et Little, M. (1996). Separation of *E. coli* expressing functional cell-wall bound antibody fragments by FACS. *Immunotechnology* 2, 97–102.
- Fugelsang, K. (1998). *Brettanomyces*: Dr Jekyll ou Mr Hyde des vins ? *Biofutur* 1998, 22–23.
- Fugelsang, K. C., et Edwards, C. G. (2007). *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. Springer.
- Fukushima, H., Tsunomori, Y., et Seki, R. (2003). Duplex real-time SYBR Green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5134–5146.
- Fulwyler, M. J. (1965). Electronic separation of biological cells by volume. *Science* 150, 910–911.
- Galafassi, S., Capusoni, C., Muktaduzzaman, M., et Compagno, C. (2013). Utilization of nitrate abolishes the “Custers effect” in *Dekkera bruxellensis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 297–303.
- Gant, V. A., Warnes, G., Phillips, I., et Savidge, G. F. (1993). The application of flow cytometry to the study of bacterial responses to antibiotics. *J. Med. Microbiol.* 39, 147–154.
- Garde-Cerdán, T., Marsellés-Fontanet, A. R., Arias-Gil, M., Ancín-Azpilicueta, C., et Martín-Belloso, O. (2008). Effect of storage conditions on the volatile composition of wines

- obtained from must stabilized by PEF during ageing without SO₂. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9, 469–476.
- Gaunt, D. M., Degn, H., et Lloyd, D. (1988). The influence of oxygen and organic hydrogen acceptors on glycolytic dioxide production in *Brettanomyces anomalus*. *Yeast* 4, 249–255.
- Gerbaux, V. (2007). Dénombrement rapide de *Brettanomyces* dans un vin rouge par cytométrie de flux. *Rev Oenolog* 123, 21–24.
- Gerbaux, V., et Thomas, J. (2009). Utilisations pratiques de la cytométrie de flux pour le suivi des levures œnologiques. *Rev. Fr. Oenologie*, 8–13.
- Gerbaux, V., Jeudy, S., et Monamy, C. (2000). Étude des phénols volatils dans les vins de Pinot noir en Bourgogne. *Bull. OIV* 73, 581–599.
- Gerbaux, V., Vincent, B., et Bertrand, A. (2002). Influence of maceration temperature and enzymes on the content of volatile phenols in Pinot noir wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 131–137.
- Gibson, F. C., Hong, C., Chou, H.-H., Yumoto, H., Chen, J., Lien, E., et al. (2004). Innate immune recognition of invasive bacteria accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 109, 2801–2806.
- Gil, J. V., Mateo, J. J., Jiménez, M., Pastor, A., et Huerta, T. (1996). Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts. *J. Food Sci.* 61, 1247–1250.
- Gilis, J.-F. (1999). *Etude des contaminations de fermentations alcooliques industrielles par les levures Brettanomyces*. PhD Thesis, INP Toulouse, Fr.
- Gilliland, R. B., et Lacey, J. P. (1964). Lethal action by an *Acetobacter* on yeasts. *Nature* 202, 727–728.
- Ginjom, I., D'Arcy, B., Caffin, N., et Gidley, M. (2011). Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process. *Food Chem.* 125, 823–834.
- Gómez-Rivas, L., Escudero-Abarca, B. I., Aguilar-Uscanga, M. G., Hayward-Jones, P. M., Mendoza, P., et Ramírez, M. (2004). Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 16–22.
- González, Á., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., et Guillamón, J. M. (2005). Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 295–304.
- González, Á., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., et Guillamón, J. M. (2006). Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 254, 123–128.

- González-Arenzana, L., Santamaría, P., López, R., Garijo, P., Gutiérrez, A. R., Garde-Cerdán, T., et al. (2013). Microwave technology as a new tool to improve microbiological control of oak barrels: a preliminary study. *Food Control* 30, 536–539.
- Gosselé, F., Mooter, M. V. den, Verdonck, L., Swings, J., et Ley, J. D. (1981). The nitrogen requirements of *Gluconobacter*, *Acetobacter* and *Frateuria*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 47, 289–296.
- Grbin, P. R. (1998). *Physiology and metabolism of Dekkera/Brettanomyces yeast in relation to mousy taint production*. PhD Thesis, The University of Adelaide, Adelaide, SA.
- Grbin, P. R., et Henschke, P. A. (2000). Mousy off-flavour production in grape juice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeasts. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6, 255–262.
- Grbin, P., Costello, P., Herderich, M., Markides, A., Henschke, P., et Lee, T. (1995). Developments in the sensory, chemical and microbiological basis of mousy taint in wine. in Adelaide, South Australia: Creina S. Stockley, et al. (eds), 57–61.
- Greenfield, S., et Claus, G. W. (1972). Nonfunctional tricarboxylic acid cycle and the mechanism of glutamate biosynthesis in *Acetobacter suboxydans*. *J. Bacteriol.* 112, 1295–1301.
- Greenspan, P., Mayer, E. P., et Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.* 100, 965–973.
- Grossman, M. K., et Becker, R. (1984). Investigations on bacterial inhibition of wine fermentation. *Kellerwirtschaft* 10, 272–275.
- Guillamon, J. M., et Mas, A. (2011). “Acetic acid bacteria,” in *Molecular wine microbiology*, 227–255.
- Guillou, S., Besnard, V., El Murr, N., et Federighi, M. (2003). Viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells exposed to low-amperage electrolysis as assessed by staining procedure and ATP content. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 85–89.
- Gullo, M., et Giudici, P. (2008). Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 46–53.
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., et Giudici, P. (2006). Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar.” *Int. J. Food Microbiol.* 106, 209–212.
- Gunnison, A. F. (1981). Sulphite toxicity: A critical review of *in vitro* and *in vivo* data. *Food Cosmet. Toxicol.* 19, 667–682.
- Guzzon, R., Nardin, T., Micheletti, O., Nicolini, G., et Larcher, R. (2013). Antimicrobial activity of ozone. Effectiveness against the main wine spoilage microorganisms and evaluation of impact on simple phenols in wine: Assay of antimicrobial activity of ozone. *Aust. J. Grape Wine Res.* 19, 180–188.

- Guzzon, R., Widmann, G., Malacarne, M., Nardin, T., Nicolini, G., et Larcher, R. (2011). Survey of the yeast population inside wine barrels and the effects of certain techniques in preventing microbiological spoilage. *Eur. Food Res. Technol.* 233, 285–291.
- Haines, T. H. (2001). Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Prog. Lipid Res.* 40, 299–324.
- Han, H.-S., Niemeyer, E., Huang, Y., Kamoun, W. S., Martin, J. D., Bhaumik, J., et al. (2015). Quantum dot/antibody conjugates for *in vivo* cytometric imaging in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 1350–1355.
- Hannig, C., Hannig, M., Rehmer, O., Braun, G., Hellwig, E., et Al-Ahmad, A. (2007). Fluorescence microscopic visualization and quantification of initial bacterial colonization on enamel *in situ*. *Arch. Oral Biol.* 52, 1048–1056.
- Harms, G., Layton, A. C., Dionisi, H. M., Gregory, I. R., Garrett, V. M., Hawkins, S. A., et al. (2003). Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 37, 343–351.
- Hauge, J. G., King, T. E., et Cheldelin, V. H. (1955). Oxidation of dihydroxyacetone via the pentose cycle in *Acetobacter suboxydans*. *J. Biol. Chem.* 214, 11–26.
- Hayashi, N., Arai, R., Tada, S., Taguchi, H., et Ogawa, Y. (2007). Detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts with a loop-mediated isothermal amplification method. *Food Microbiol.* 24, 778–785.
- Heinz, V., Toepfl, S., et Knorr, D. (2003). Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 4, 167–175.
- Henderson, L. M., et Chappell, J. B. (1993). Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur. J. Biochem.* 217, 973–980.
- Henick-Kling, T. (1993). Malolactic fermentation. *Wine Microbiol. Biotechnol.*, 289–326.
- Henry-Stanley, M. J., Garni, R. M., et Wells, C. L. (2004). Adaptation of FUN-1 and Calcofluor white stains to assess the ability of viable and nonviable yeast to adhere to and be internalized by cultured mammalian cells. *J. Microbiol. Methods* 59, 289–292.
- Heresztyn, T. (1986a). Formation of substituted tetrahydropyridines by species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* isolated from mousy wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 127–132.
- Heresztyn, T. (1986b). Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. *Arch. Microbiol.* 146, 96–98.
- Hernán-Gómez, S., Espinosa, J. C., et Ubeda, J. F. (2000). Characterization of wine yeasts by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *FEMS Microbiol. Lett.* 193, 45–50.

- Herrero, M., Quirós, C., García, L. A., et Díaz, M. (2006). Use of flow cytometry to follow the physiological states of microorganisms in cider fermentation processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6725–6733.
- Hesford, F., Schneider, K., Porret, N. A., et Gafner, J. (2004). Identification and analysis of 4-ethyl catechol in wine tainted by *Brettanomyces* off-flavor. *Am J Enol Vitic* 55.
- Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., González, Á., Mas, A., et Guillamón, J. M. (2006). Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7148–7155.
- Holm, C., et Jespersen, L. (2003). A flow-cytometric Gram-staining technique for milk-associated bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2857–2863.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., et Williams, S. T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. *Baltim. MD* 152.
- Hotzel, H., Müller, W., et Sachse, K. (1999). Recovery and characterization of residual DNA from beer as a prerequisite for the detection of genetically modified ingredients. *Eur. Food Res. Technol.* 209, 192–196.
- Hui, Y. H. (2006). *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering*. CRC Press.
- Huijsdens, X. W., Linskens, R. K., Mak, M., Meuwissen, S. G. M., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., et Savelkoul, P. H. M. (2002). Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4423–4427.
- Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K., et Engel, K.-H. (1998). Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Z. Für Leb. -Forsch. A* 206, 203–207.
- Hwang, J. W., Yang, Y. K., Hwang, J. K., Pyun, Y. R., et Kim, Y. S. (1999). Effects of pH and dissolved oxygen on cellulose production by *Acetobacter xylinum* BRC5 in agitated culture. *J. Biosci. Bioeng.* 88, 183–188.
- Ibeas, J. I., Lozano, I., Perdignes, F., et Jimenez, J. (1996). Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 998–1003.
- Ilabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., Romero, J., et Mas, A. (2008). Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 245–249.
- Imai, T., et Ohno, T. (1995). The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3604–3608.
- Inácio, J., Behrens, S., Fuchs, B. M., Fonseca, Á., Spencer-Martins, I., et Amann, R. (2003). *In situ* accessibility of *Saccharomyces cerevisiae* 26S rRNA to Cy3-labeled oligonucleotide probes comprising the D1 and D2 domains. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2899–2905.

- Institut Français de la Vigne et du Vin (2002). Maîtrise du sulfitage des moûts et des vins - n° 3.
- Ishii, S., Segawa, T., et Okabe, S. (2013). Simultaneous quantification of multiple food and waterborne pathogens by use of microfluidic quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 205–213.
- Izquierdo-Cañas, P. M., García-Romero, E., Huertas-Nebreda, B., et Gómez-Alonso, S. (2012). Colloidal silver complex as an alternative to sulphur dioxide in winemaking. *Food Control* 23, 73–81.
- Jakob, F., Pfaff, A., Novoa-Carballal, R., Rübsam, H., Becker, T., et Vogel, R. F. (2013). Structural analysis of fructans produced by acetic acid bacteria reveals a relation to hydrocolloid function. *Carbohydr. Polym.* 92, 1234–1242.
- Jara, C., Mateo, E., Guillamón, J. M., Torija, M. J., et Mas, A. (2008). Analysis of several methods for the extraction of high quality DNA from acetic acid bacteria in wine and vinegar for characterization by PCR-based methods. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 336–341.
- Jayakody, L. N., Kadowaki, M., Tsuge, K., Horie, K., Suzuki, A., Hayashi, N., et al. (2014). SUMO expression shortens the lag phase of *Saccharomyces cerevisiae* yeast growth caused by complex interactive effects of major mixed fermentation inhibitors found in hot-compressed water-treated lignocellulosic hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 501–515.
- Jayasena, S. D. (1999). Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.* 45, 1628–1650.
- Jiang, J., Alderisio, K. A., Singh, A., et Xiao, L. (2005). Development of procedures for direct extraction of cryptosporidium DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1135–1141.
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., et Pretorius, I. S. (2003). The occurrence of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. *Afr J Enol Vitic* 24, 35.
- Josefsen, M. H., Löfström, C., Hansen, T. B., Christensen, L. S., Olsen, J. E., et Hoorfar, J. (2010). Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5097–5104.
- Joseph, C. M. L., et Bisson, L. (2004). Physiological diversity of *Brettanomyces/Dekkera* isolated from wine. *Am J Enol Vitic* 55, 302–A.
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., et Ribéreau-Gayon, P. (1984). Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 153–156.

- Julius, M. H., Masuda, T., et Herzenberg, L. A. (1972). Demonstration that antigen-binding cells are precursors of antibody-producing cells after purification with a fluorescence-activated cell sorter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 1934–1938.
- Kahana, J. A., Schnapp, B. J., et Silver, P. A. (1995). Kinetics of spindle pole body separation in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 9707–9711.
- Kitagaki, H., et Shimoi, H. (2007). Mitochondrial dynamics of yeast during sake brewing. *J. Biosci. Bioeng.* 104, 227–230.
- Kobayashi, M., Shimizu, H., et Shioya, S. (2007). Physiological analysis of yeast cells by flow cytometry during serial-repitching of low-malt beer fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 451–456.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., et Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 51–63.
- Krøjgaard, L. H., Krogfelt, K. A., Albrechtsen, H.-J., et Uldum, S. A. (2011). Detection of *Legionella* by quantitative-polymerase chain reaction (qPCR) for monitoring and risk assessment. *BMC Microbiol.* 11, 254.
- Kunkee, R. E., et Amerine, M. A. (1970). Yeasts in wine-making. *The yeasts* 3, 5–71.
- Lafon Lafourcade, S., et Joyeux, A. (1981). Les bactéries acétiques du vin [*Gluconobacter*, *Acetobacter*]. *Bull. OIV.*
- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E., et Ribéreau-Gayon, P. (1983). Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 874–880.
- Lafon-Lafourcade, S., Geneix, C., et Ribéreau-Gayon, P. (1984). Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 1246–1249.
- Laforgue, R., et Lonvaud-Funel, A. (2012). Hydroxycinnamic acid decarboxylase activity of *Brettanomyces bruxellensis* involved in volatile phenol production: Relationship with cell viability. *Food Microbiol.* 32, 230–234.
- Landolfo, S., Politi, H., Angelozzi, D., et Mannazzu, I. (2008). ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1780, 892–898.
- Laohaprertthisan, V., Chowdhury, A., Kongmuang, U., Kalnauwakul, S., Ishibashi, M., Matsumoto, C., et al. (2003). Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand. *Epidemiol. Infect.* 130, 395–406.

- Larcher, R., Nicolini, G., Puecher, C., Bertoldi, D., Moser, S., et Favaro, G. (2007). Determination of volatile phenols in wine using high-performance liquid chromatography with a coulometric array detector. *Anal. Chim. Acta* 582, 55–60.
- Lehtonen, P. (1996). Determination of amines and amino acids in wine — A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 127–133.
- Lema, C., Garcia-Jares, C., Orriols, I., et Angulo, L. (1996). Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 206–216.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., et Faucher, S. P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 5.
- Licker, J. L., Acree, T. E., et Henick-Kling, T. (1998). “What is ‘brett’ (*Brettanomyces*) flavor?: A preliminary investigation”. *Chemistry of Wine Flavor*, 8, 96–115.
- Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van den Eede, G., et al. (2001). Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *Eur. Food Res. Technol.* 212, 497–504.
- Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J., et Anklam, E. (1999). IUPAC collaborative trial study of a method to detect genetically modified soy beans and maize in dried powder. *J. AOAC Int.* 82, 923–928.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., et Komagata, K. (2001). Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 47, 119–131.
- Lisdiyanti, P., Navarro, R. R., Uchimura, T., et Komagata, K. (2006). Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2101–2111.
- Liu, Y., Forcisi, S., Harir, M., Deleris-Bou, M., Krieger-Weber, S., Lucio, M., et al. (2016). New molecular evidence of wine yeast-bacteria interaction unraveled by non-targeted exometabolomic profiling. *Metabolomics* 12, 1–16.
- Lloyd, D., et Hayes, A. J. (1995). Vigour, vitality and viability of microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 133, 1–7.
- Loganathan, P., et Nair, S. (2004). *Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1185–1190.

- Longin, C., Guilloux-Benatier, M., et Alexandre, H. (2016). Design and performance testing of a DNA extraction assay for sensitive and reliable quantification of acetic acid bacteria directly in red wine using real time PCR. *Front. Microbiol.* 7.
- Longobardi-Givan, A. (2013). *Flow Cytometry: First Principles*. John Wiley & Sons.
- Loubiere, P., Salou, P., Leroy, M. J., Lindley, N. D., et Pareilleux, A. (1992). Electrogenic malate uptake and improved growth energetics of the malolactic bacterium *Leuconostoc oenos* grown on glucose-malate mixtures. *J. Bacteriol.* 174, 5302–5308.
- Loureiro, V., et Malfeita-Ferreira, M. (2006). *Food Spoilage Microorganisms*. Woodhead Publishing. Cambridge, UK: Blackburn, C de W.
- Ludwig, W., et Schleifer, K.-H. (2000). How quantitative is quantitative PCR with respect to cell counts? *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 556–562.
- Luo, H., Yousef, A. e., et Wang, H. h. (2004). A real-time polymerase chain reaction-based method for rapid and specific detection of spoilage *Alicyclobacillus* spp. in apple juice. *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 376–382.
- Lustrato, G., Alfano, G., De Leonardis, A., Macciola, V., et Ranalli, G. (2015). Inactivation of *Dekkera bruxellensis* yeasts in wine storage in brand new oak barrels using low electric current technology. *Ann. Microbiol.* 65, 2091–2098.
- Lustrato, G., Vigentini, I., De Leonardis, A., Alfano, G., Tirelli, A., Foschino, R., et al. (2010). Inactivation of wine spoilage yeasts *Dekkera bruxellensis* using low electric current treatment (LEC). *J. Appl. Microbiol.* 109, 594–604.
- Malacrinò, P., Zapparoli, G., Torriani, S., et Dellaglio, F. (2001). Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *J. Microbiol. Methods* 45, 127–134.
- Malherbe, S., Bauer, F. F., Toit, M. D., et others (2007). Understanding problem fermentations-A review. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 28, 169.
- Malorny, B., et Hoorfar, J. (2005). Toward standardization of diagnostic PCR testing of fecal samples: lessons from the detection of *Salmonellae* in pigs. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3033–3037.
- Mannazzu, I., Angelozzi, D., Belviso, S., Budroni, M., Farris, G. A., Goffrini, P., et al. (2008). Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: Cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 84–91.
- Mansfield, A. K., Zoecklein, B. W., et Whiton, R. S. (2002). Quantification of glycosidase activity in selected strains of *Brettanomyces bruxellensis* and *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 303–307.

- Marsit, S., Mena, A., Bigey, F., Sauvage, F.-X., Couloux, A., Guy, J., et al. (2015). Evolutionary advantage conferred by an Eukaryote-to-Eukaryote gene transfer event in wine yeasts. *Mol. Biol. Evol.* 32, 1695–1707.
- Martorell, P., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Fernández-Espinar, M. T., Loureiro, V., et Querol, A. (2006). Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 79–84.
- Mas, A., Puig, J., Lladoa, N., et Zamora, F. (2002). Sealing and storage position effects on wine evolution. *J. Food Sci.* 67, 1374–1378.
- Mason, D. J., Shanmuganathan, S., Mortimer, F. C., et Gant, V. A. (1998). A fluorescent Gram stain for flow cytometry and epifluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2681–2685.
- Matsushita, K., Nonobe, M., Shinagawa, E., Adachi, O., et Ameyama, M. (1985). Isolation and characterization of outer and cytoplasmic membranes from spheroplasts of *Acetobacter aceti*. *Agric. Biol. Chem.* 49, 3519–3526.
- Matsushita, K., Toyama, H., et Adachi, O. (1994). Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 36, 247.
- Mattoussi, H., Mauro, J. M., Goldman, E. R., Anderson, G. P., Sundar, V. C., Mikulec, F. V., et al. (2000). Self-assembly of CdSe–ZnS quantum dot bioconjugates using an engineered recombinant protein. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 12142–12150.
- McKillip, J. L., Jaykus, L.-A., et Drake, M. (1998). rRNA stability in heat-killed and UV-irradiated enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4264–4268.
- Mehlomakulu, N. N., Setati, M. E., et Divol, B. (2014). Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 188, 83–91.
- Mendes-Ferreira, A., Sampaio-Marques, B., Barbosa, C., Rodrigues, F., Costa, V., Mendes-Faia, A., et al. (2010). Accumulation of non-superoxide anion reactive oxygen species mediates nitrogen-limited alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7918–7924.
- Mesa, M. M., Macías, M., Cantero, D., et Barja, F. (2003). Use of the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of viable and total acetic acid bacteria from vinegar fermentation. *J. Fluoresc.* 13, 261–265.
- Meyer, M., Scheper, T., et Walter, J.-G. (2013). Aptamers: versatile probes for flow cytometry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7097–7109.
- Meyer, R., et Jaccaud, E. (1997). Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of

- Glyphosate-Tolerant Soybeans. in *Proceedings of the Euro food chem.(IX, 8 th-10 th September, 1997, Interlaken, Switzerland). Conference*, 1.
- Millet, V., et Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 136–141.
- Miot-Sertier, C., et Lonvaud-Funel, A. (2007). Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the strain level. *J. Appl. Microbiol.* 102, 555–562.
- Mitrakul, C. M., Henick-Kling, T., et Egli, C. M. (1999). Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA finger-printing methods. *Food Microbiol.* 16, 3–14.
- Moat, A. G., Foster, J. W., et Spector, M. P. (2003). *Microbial Physiology*. John Wiley & Sons.
- Monthéard, J., Garcier, S., Lombard, E., Cameleyre, X., Guillouet, S., Molina-Jouve, C., et al. (2012). Assessment of *Candida shehatae* viability by flow cytometry and fluorescent probes. *J. Microbiol. Methods* 91, 8–13.
- Moon, J.-H., Kim, G., Park, S. B., Lim, J., et Mo, C. (2014). The importance of FACS analysis in the development of aptamers specific to pathogens. *J. Biosyst. Eng.* 39, 111–114.
- Morata, A., Benito, S., González, M. C., Palomero, F., Tesfaye, W., et Suárez-Lepe, J. A. (2012). Cold pasteurisation of red wines with high hydrostatic pressure to control *Dekkera/Brettanomyces*: effect on both aromatic and chromatic quality of wine. *Eur. Food Res. Technol.* 235, 147–154.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Colomo, B., et Suárez, J. A. (2004). Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. *Eur. Food Res. Technol.* 220, 341–346.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Suberviola, J., Bartolomé, B., Colomo, B., et Suárez, J. A. (2003). Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4084–4088.
- Morneau, A. d., Zuehlke, J. m., et Edwards, C. g. (2011). Comparison of media formulations used to selectively cultivate *Dekkera/Brettanomyces*. *Lett. Appl. Microbiol.* 53, 460–465.
- Moter, A., et Göbel, U. B. (2000). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 41, 85–112.
- Müller, S., Ullrich, S., Lösche, A., Loffhagen, N., et Babel, W. (2000). Flow cytometric techniques to characterise physiological states of *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Microbiol. Methods* 40, 67–77.
- Müllner, H., et Daum, G. (2004). Dynamics of neutral lipid storage in yeast. *Acta Biochim. Pol.* 51, 323–347.

- Munoz, R., Morena-Arribas, M. V., et De las Rivas, B. (2011). “Lactic acid bacteria,” in *Molecular wine microbiology*, 191–226.
- Murat, M.-L., et Dumeau, F. (2003). Impact of fining on population levels of certain spoilage micro-organisms in red wines. *Aust. N. Z. Grapegrow. Winemak.*, 92–94.
- Nanba, A., Tamura, A., et Nagai, S. (1984). Synergistic effects of acetic acid and ethanol on the growth of *Acetobacter* sp. *J. Ferment. Technol.* 62, 501–505.
- Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H., et al. (2001). Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (Komesu) and unpolished rice vinegar (Kurosu) produced in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 986–990.
- Nardi, T., Vagnoli, P., Minacci, A., Gautier, S., et Sieczkowski, N. (2014). Evaluating the impact of a fungal-origin chitosan preparation on *Brettanomyces bruxellensis* in the context of wine aging. *Wine Stud.* 3.
- Nazaris, B., Gontier, É., Geay, L., Mansour, C., Moine, V., et Coulon, J. (2016). Effet préventif et curatif de préparations à base de chitosane sur le développement de *Brettanomyces bruxellensis* ; Observations macroscopiques et microscopiques. *Rev. Oenologues*, 39–41.
- Nehme, N., Mathieu, F., et Taillandier, P. (2010). Impact of the co-culture of *Saccharomyces cerevisiae*–*Oenococcus oeni* on malolactic fermentation and partial characterization of a yeast-derived inhibitory peptidic fraction. *Food Microbiol.* 27, 150–157.
- Nicolini, G., Larcher, R., Bertoldi, D., Puecher, C., et Magno, F. (2015). Rapid quantification of 4-ethylphenol in wine using high-performance liquid chromatography with a fluorimetric detector. *VITIS-J. Grapevine Res.* 46, 202.
- Niedenthal, R. K., Riles, L., Johnston, M., et Hegemann, J. H. (1996). Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast* 12, 773–786.
- Not, F., Simon, N., Biegala, I. C., Vaultot, D., et al. (2002). Application of fluorescent *in situ* hybridization coupled with tyramide signal amplification (FISH-TSA) to assess eukaryotic picoplankton composition. *Aquat. Microb. Ecol.* 28, 157–166.
- O’Neill, K., Aghaeepour, N., Špidlen, J., et Brinkman, R. (2013). Flow cytometry bioinformatics. *PLoS Comput Biol* 9, e1003365.
- Oelofse, A., Lonvaud-Funel, A., et du Toit, M. (2009). Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiol.* 26, 377–385.
- Oelofse, A., Pretorius, I. S., et Du Toit, M. (2008). Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking : a synoptic review. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 29, 128–144.

- OIV (2005). Practical guide for the validation, quality control, et uncertainty assessment of an alternative oenological analysis method. *Int. Off. Wine OIV* <http://www.oiv.int/>.
- Oliver, J. D. (1995). The viable but non-culturable state in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 133, 203–208.
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 43, 93–100.
- Oliver, J. D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 415–425.
- Orij, R., Postmus, J., Ter Beek, A., Brul, S., et Smits, G. J. (2009). In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology* 155, 268–278.
- Oro, L., Ciani, M., Bizzaro, D., et Comitini, F. (2016). Evaluation of damage induced by Kwkt and Pikt zymocins against *Brettanomyces/Dekkera* spoilage yeast, as compared to sulphur dioxide. *J. Appl. Microbiol.* 121, 207–214.
- Ough, C. S., Kunkee, R. E., Vilas, M. R., Bordeu, E., et Huang, M.-C. (1988). The interaction of sulfur dioxide, pH, and dimethyl dicarbonate on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* Montrachet and *Leuconostoc oenos* MCW. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 279–282.
- Pastorkova, E., Zakova, T., Landa, P., Novakova, J., Vadlejch, J., et Kokoska, L. (2013). Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeasts and acetic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 161, 209–213.
- Perez, L., Valcarcel, M. J., Gonzalez, P., et Domecq, B. (1991). Influence of *Botrytis* infection of the grapes on the biological aging process of fino sherry. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 58–62.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., et Amann, R. (2002). Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3094–3101.
- Perrot, L., Charpentier, M., Charpentier, C., Feuillat, M., et Chassagne, D. (2002). Yeast adapted to wine: nitrogen compounds released during induced autolysis in a model wine. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29, 134–139.
- Peynaud, E., et Domercq, S. (1956). Sur les *Brettanomyces* isolés de raisins et de vins. *Arch. Für Mikrobiol.* 24, 266–280.
- Phister, T. G., et Mills, D. A. (2003). Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7430–7434.
- Phister, T. G., et Mills, D. A. (2004). Novel methods to detect *Brettanomyces* (*Dekkera*) in wine. in *Technical abstracts, 55th annual meeting, San Diego, CA, American Society for Enology and Viticulture, Davis, CA.*

- Poms, R., Glössl, J., et Foissy, H. (2001). Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat. *Eur. Food Res. Technol.* 213, 361–365.
- Portugal, C., Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., Torres, C., Cacho, J., et al. (2013). *Brettanomyces* susceptibility to antimicrobial agents used in winemaking: in vitro and practical approaches. *Eur. Food Res. Technol.* 238, 641–652.
- Prakitchaiwattana, C. J., Fleet, G. H., et Heard, G. M. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res.* 4, 865–877.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675–729.
- Prosperi, E., Croce, A. C., Bottiroli, G., et Supino, R. (1986). Flow cytometric analysis of membrane permeability properties influencing intracellular accumulation and efflux of fluorescein. *Cytometry* 7, 70–75.
- Puértolas, E., López, N., Condón, S., Raso, J., et Álvarez, I. (2009). Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 130, 49–55.
- Puig, A., Vilavella, M., Daoudi, L., Gouamis, B., et Minguéz, S. (2003). Stabilisation microbiologique et biochimique des vins par application de la technique de hautes pressions. *Bull. OIV Rev. Int. Vitic. Oenologie Econ. Droit Viti-Vinic.* 76, 596–618.
- Quintero, Y., Poblet, M., Guillamón, J. m., et Mas, A. (2009). Quantification of the expression of reference and alcohol dehydrogenase genes of some acetic acid bacteria in different growth conditions. *J. Appl. Microbiol.* 106, 666–674.
- Quirós, C., Herrero, M., García, L. A., et Díaz, M. (2009). Quantitative approach to determining the contribution of viable-but-nonculturable subpopulations to malolactic fermentation processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2977–2981.
- Ramana, K. V., Tomar, A., et Singh, L. (2000). Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 245–248.
- Rathnayaka, U. S. K., et Rakshit, S. K. (2010). The stability of rRNA in heat-killed *Salmonella enterica* cells and its detection by fluorescent *in situ* hybridisation (FISH). *Trop. Life Sci. Res.* 21, 47–53.
- Razmkhab, S., Lopez-Toledano, A., Ortega, J. M., Mayen, M., Merida, J., et Medina, M. (2002). Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7432–7437.
- Renouf, V., et Lonvaud-Funel, A. (2007). Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiol. Res.* 162, 154–167.

- Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M. C., De Revel, G., et Lonvaud-Funel, A. (2006). Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1208–1219.
- Ribéreau-Gayon, J., Dubourdieu, D., Domèche, B., et Lonvaud, A. (2004). *Traité d'oenologie-Tome 1 Microbiologie du vin Vinification*. Dunod.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., et Dubourdieu, D. (2012). *Traité d'oenologie-Tome 2 Chimie du vin. Stabilisation et traitements*. Dunod
- Rizk, Z., El Rayess, Y., Ghanem, C., Mathieu, F., Taillandier, P., et Nehme, N. (2016). Impact of inhibitory peptides released by *Saccharomyces cerevisiae* BDX on the malolactic fermentation performed by *Oenococcus oeni* Vitilactic F. *Int. J. Food Microbiol.* 233, 90–96.
- Rizzotti, L., Levav, N., Fracchetti, F., Felis, G. E., et Torriani, S. (2015). Effect of UV-C treatment on the microbial population of white and red wines, as revealed by conventional plating and PMA-qPCR methods. *Food Control* 47, 407–412.
- Röder, C., König, H., et Fröhlich, J. (2007). Species-specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA. *FEMS Yeast Res.* 7, 1013–1026.
- Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., et Loureiro, V. (2001). Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *J. Appl. Microbiol.* 90, 588–599.
- Rodriguez, S. b., et Thornton, R. j. (2008). Use of flow cytometry with fluorescent antibodies in real-time monitoring of simultaneously inoculated alcoholic-malolactic fermentation of Chardonnay. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 38–42.
- Romano, A., Perello, M. c., Revel, G. de, et Lonvaud-Funel, A. (2008). Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1577–1585.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., et Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 169–180.
- Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., et Rasmussen, O. F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17, 37–45.
- Roth, B. L., Poot, M., Yue, S. T., et Millard, P. J. (1997). Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2421–2431.

- Rousselon, N., Delgenès, J.-P., et Godon, J.-J. (2004). A new real time PCR (TaqMan® PCR) system for detection of the 16S rDNA gene associated with fecal bacteria. *J. Microbiol. Methods* 59, 15–22.
- Rozpędowska, E., Hellborg, L., Ishchuk, O. P., Orhan, F., Galafassi, S., Merico, A., et al. (2011). Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nat. Commun.* 2, 302.
- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., et Guillamón, J. M. (2000). Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 1981–1987.
- Salema, M., Capucho, I., Poolman, B., Romão, M. V. S., et Dias, M. C. (1996). *In vitro* reassembly of the malolactic fermentation pathway of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*). *J. Bacteriol.* 178, 5537–5539.
- Salema, M., Poolman, B., Lolkema, J. S., Dias, M. C. L., et Konings, W. N. (1994). Uniport of monoanionic L-malate in membrane vesicles from *Leuconostoc oenos*. *Eur. J. Biochem.* 225, 289–295.
- Salinas, F., Garrido, D., Ganga, A., Veliz, G., et Martínez, C. (2009). TaqMan real-time PCR for the detection and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* in wine. *Food Microbiol.* 26, 328–332.
- Salma, M. (2013). *Etude et caractérisation de l'état "Viable mais Non Cultivable" chez Saccharomyces cerevisiae*. PhD Tesis, IUVV, Université de Bourgogne, Fr.
- Salma, M., Rousseaux, S., Sequeira-Le Grand, A., et Alexandre, H. (2012). Cytofluorometric detection of wine lactic acid bacteria: application of malolactic fermentation to the monitoring. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 63–73.
- Salma, M., Rousseaux, S., Sequeira-Le Grand, A., Divol, B., et Alexandre, H. (2013). Characterization of the viable but nonculturable (VBNC) state in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* 8.
- Santos, A., Navascués, E., Bravo, E., et Marquina, D. (2011). Ustilago maydis killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 147–154.
- Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E., et Marquina, D. (2009). PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology* 155, 624–634.
- Schmid, F., Grbin, P., Yap, A., et Jiranek, V. (2011). Relative efficacy of high pressure hot water and high power ultrasonics for wine oak barrel sanitization. *Am. J. Enol. Vitic.* 519-526.
- Schnürer, J., et Rosswall, T. (1982). Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1256–1261.

- Schönhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S., et Amann, R. (1997). Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3268–3273.
- Seearunruangchai, A., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Thawai, C., Itoh, T., et Yamada, Y. (2004). Identification of acetic acid bacteria isolated from fruits collected in Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 50, 47–53.
- Sekar, R., Pernthaler, A., Pernthaler, J., Warnecke, F., Posch, T., et Amann, R. (2003). An improved protocol for quantification of freshwater *Actinobacteria* by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2928–2935.
- Sengun, I. Y., et Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control* 22, 647–656.
- Serpaggi, V. (2011). *Etude et caractérisation de l'état «Viable mais Non Cultivable» chez Brettanomyces, une levure d'altération des vins*. PhD Tesis, IUVV, Université de Bourgogne, Fr.
- Serpaggi, V., Remize, F., Sequeira-Le Grand, A., et Alexandre, H. (2010). Specific identification and quantification of the spoilage microorganism *Brettanomyces* in wine by flow cytometry: A useful tool for winemakers. *Cytometry A* 77A, 497–499.
- Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., et Alexandre, H. (2012). Characterization of the “viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiol.* 30, 438–447.
- Shapiro, H. M. (2005). *Practical Flow Cytometry*. John Wiley & Sons.
- Sheridan, G. E. C., Masters, C. I., Shallcross, J. A., et Mackey, B. M. (1998). Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1313–1318.
- Shi, H., Xu, W., Trinh, Q., Luo, Y., Liang, Z., Li, Y., et al. (2012). Establishment of a viable cell detection system for microorganisms in wine based on ethidium monoazide and quantitative PCR. *Food Control* 27, 81–86.
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, J. C., Bryan, M., et Wu, Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *J Food Agric Env.* 1.
- Shiroma, S., Jayakody, L. N., Horie, K., Okamoto, K., et Kitagaki, H. (2014). Enhancement of ethanol fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast by disrupting mitophagy function. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1002–1012.
- Shroff, K. E., Meslin, K., et Cebra, J. J. (1995). Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. *Infect. Immun.* 63, 3904–3913.

- Sievers, M., Sellmer, S., et Teuber, M. (1992). *Acetobacter europaeus* sp. nov., a main component of industrial vinegar fermenters in central Europe. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 386–392.
- Silva, L. R., Cleenwerck, I., Rivas, R., Swings, J., Trujillo, M. E., Willems, A., et al. (2006). *Acetobacter oeni* sp. nov., isolated from spoiled red wine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 21–24.
- Sizemore, R. K., Caldwell, J. J., et Kendrick, A. S. (1990). Alternate gram staining technique using a fluorescent lectin. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2245–2247.
- Smith, B. D., et Divol, B. (2016). *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages. *Food Microbiol.* 59, 161–175.
- Snowdon, E. M., Bowyer, M. C., Grbin, P. R., et Bowyer, P. K. (2006). Mousy off-flavor: A review. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6465–6474.
- Sokollek, S. J., Hertel, C., et Hammes, W. P. (1998). Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *J. Biotechnol.* 60, 195–206.
- Stead, D. (1995). The effect of hydroxycinnamic acids and potassium sorbate on the growth of 11 strains of spoilage yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 82–87.
- Steels, H., James, S. A., Roberts, I. N., et Stratford, M. (2000). Sorbic acid resistance: the inoculum effect. *Yeast* 16, 1173–1183.
- Steensels, J., Meersman, E., Snoek, T., Saels, V., et Verstrepen, K. J. (2014). Large-scale selection and breeding to generate industrial yeasts with superior aroma production. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6965–6975.
- Stender, H., Kurtzman, C., Hyldig-Nielsen, J. J., Sørensen, D., Broomer, A., Oliveira, K., et al. (2001). Identification of *Dekkera bruxellensis* (*Brettanomyces*) from wine by fluorescence *in situ* hybridization using peptide nucleic acid probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 938–941.
- Stoeckel, D. M., Stelzer, E. A., et Dick, L. K. (2009). Evaluation of two spike-and-recovery controls for assessment of extraction efficiency in microbial source tracking studies. *Water Res.* 43, 4820–4827.
- Sturm, M. E., Arroyo-López, F. N., Garrido-Fernández, A., Querol, A., Mercado, L. A., Ramirez, M. L., et al. (2014). Probabilistic model for the spoilage wine yeast *Dekkera bruxellensis* as a function of pH, ethanol and free SO₂ using time as a dummy variable. *Int. J. Food Microbiol.* 170, 83–90.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J. A., Morata, A., et Calderón, F. (2007). The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chem.* 102, 10–21.

- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., et Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 139–173.
- Tada, Y., et Grossart, H.-P. (2014). Community shifts of actively growing lake bacteria after N-acetyl-glucosamine addition: improving the BrdU-FACS method. *ISME J.* 8, 441–454.
- Taillandier, P., Barbin, P., Gilis, J., et Strehaiano, P. (2008). Facteurs favorisant le développement de *Brettanomyces*. *IFV MIDI-Pyrén. -Rencontre Tech. Micro-Org. Gest. Therm.*, 10.
- Taillandier, P., Joannis-Cassan, C., Jentzer, J.-B., Gautier, S., Sieczkowski, N., Granes, D., et al. (2014). Effect of a fungal chitosan preparation on *Brettanomyces bruxellensis*, a wine contaminant. *J. Appl. Microbiol.*, 123-131.
- Tchobanov, I., Gal, L., Guilloux-Benatier, M., Remize, F., Nardi, T., Guzzo, J., et al. (2008). Partial vinylphenol reductase purification and characterization from *Brettanomyces bruxellensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 284, 213–217.
- Teranishi, R., Buttery, R. G., et Guadagni, D. G. (1975). Odor, thresholds, and molecular structure. in *Geruch und Geschmackstoffe Internationales Symposium*
- Tesnière, C., Delobel, P., Pradal, M., et Blondin, B. (2013). Impact of nutrient imbalance on wine alcoholic fermentations: nitrogen excess enhances yeast cell death in lipid-limited must. *PLoS ONE* 8, e61645.
- Tessonnière, H., Vidal, S., Barnavon, L., Alexandre, H., et Remize, F. (2009). Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 129, 237–243.
- Thurnheer, T., Gmür, R., et Guggenheim, B. (2004). Multiplex FISH analysis of a six-species bacterial biofilm. *J. Microbiol. Methods* 56, 37–47.
- Thurnheer, T., Gmür, R., Giertsen, E., et Guggenheim, B. (2001). Automated fluorescent *in situ* hybridization for the specific detection and quantification of oral streptococci in dental plaque. *J. Microbiol. Methods* 44, 39–47.
- Torija, M. J., Mateo, E., Guillamón, J. M., et Mas, A. (2010). Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan–MGB probes. *Food Microbiol.* 27, 257–265.
- Toulmé, J., et Giegé, R. (1998). Les aptamères : des ligands et des catalyseurs oligonucléotidiques obtenus par sélection *in vitro*. *médecine/sciences* 14, 155.
- Tourdot-Maréchal, R., Gaboriau, D., Beney, L., et Diviès, C. (2000). Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 269–273.

- Trcek, J. (2005). Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S–23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 735–745.
- Trček, J., Lipoglavšek, L., et Avguštin, G. (2016). 16S rRNA *in situ* hybridization followed by flow cytometry for rapid identification of acetic acid bacteria involved in submerged industrial vinegar production. *Food Technol. Biotechnol.* 54.
- Umiker, N. L., Descenzo, R. A., Lee, J., et Edwards, C. G. (2013). Removal of *Brettanomyces bruxellensis* from red wine using membrane filtration. *J. Food Process. Preserv.* 37, 799–805.
- Usseglio-Tomasset, L., et Bosia, P. D. (1984). *FV OIV, n°784*.
- Valepyn, E., Berezina, N., et Paquot, M. (2012). Optimization of production and preliminary characterization of new exopolysaccharides from *Gluconacetobacter hansenii* LMG1524. *Adv. Microbiol.* 2, 488–496.
- Valera, M. J., Torija, M. J., Mas, A., et Mateo, E. (2013). *Acetobacter malorum* and *Acetobacter cerevisiae* identification and quantification by real-time PCR with TaqMan-MGB probes. *Food Microbiol.* 36, 30–39.
- Valera, M. J., Torija, M. J., Mas, A., et Mateo, E. (2015). Acetic acid bacteria from biofilm of strawberry vinegar visualized by microscopy and detected by complementing culture-dependent and culture-independent techniques. *Food Microbiol.* 46, 452–462.
- Valero, E., Millán, C., Ortega, J. M., et Mauricio, J. C. (2003). Concentration of amino acids in wine after the end of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Sci. Food Agric.* 83, 830–835.
- van Den Berg, M. A., et Steensma, H. Y. (1995). ACS2, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding acetyl-coenzyme a synthetase, essential for growth on glucose. *Eur. J. Biochem.* 231, 704–713.
- van der Walt, J. P., et Van Kerken, A. E. (1958). The wine yeasts of the Cape. *Antonie Van Leeuwenhoek* 24, 239–252.
- van der Walt, J. P., et Van Kerken, A. E. (1960). The wine yeasts of the Cape. *Antonie Van Leeuwenhoek* 26, 292–296.
- van Doorn, R., Klerks, M. M., Gent-Pelzer, M. P. E. van, Speksnijder, A. G. C. L., Kowalchuk, G. A., et Schoen, C. D. (2009). Accurate quantification of microorganisms in PCR-inhibiting environmental DNA extracts by a novel internal amplification control approach using biotrove openarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7253–7260.
- van Zyl, J. (1962). Turbidity in South African dry wines caused by the development of the *Brettanomyces* yeasts. *Sci. Bull. Agric. Tech. Serv.*

- Vandecasteele, S. J., Peetermans, W. E., Merckx, R., et Eldere, J. V. (2001). Quantification of expression of *Staphylococcus epidermidis* housekeeping genes with Taqman quantitative PCR during *in vitro* growth and under different conditions. *J. Bacteriol.* 183, 7094–7101.
- Vaughn, R. H. (1955). “Bacterial spoilage of wines with special reference to California conditions,” in *Advances in Food Research*, ed.E.M. Mrak and G.F. Stewart (Academic Press), 67–108.
- Vendrame, M., Iacumin, L., Manzano, M., et Comi, G. (2013). Use of propidium monoazide for the enumeration of viable *Oenococcus oeni* in must and wine by quantitative PCR. *Food Microbiol.* 35, 49–57.
- Vendrame, M., Manzano, M., Comi, G., Bertrand, J., et Iacumin, L. (2014). Use of propidium monoazide for the enumeration of viable *Brettanomyces bruxellensis* in wine and beer by quantitative PCR. *Food Microbiol.* 42, 196–204.
- Vieira-Pinto, M., Oliveira, M., Aranha, J., Martins, C., et Bernardo, F. (2008). Influence of an enrichment step on *Salmonella* sp. detection by fluorescent *in situ* hybridization on pork samples. *Food Control* 19, 286–290.
- Vigentini, I., Joseph, C. M. L., Picozzi, C., Foschino, R., et Bisson, L. F. (2013). Assessment of the *Brettanomyces bruxellensis* metabolome during sulphur dioxide exposure. *FEMS Yeast Res.* 13, 597–608.
- Vigentini, I., Picozzi, C., et Foschino, R. (2011). Intron splice site PCR analysis as a tool to discriminate *Dekkera bruxellensis* strains. *Ann. Microbiol.* 61, 153–157.
- Vigentini, I., Romano, A., Compagno, C., Merico, A., Molinari, F., Tirelli, A., et al. (2008). Physiological and oenological traits of different *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions. *FEMS Yeast Res.* 8, 1087–1096.
- Villalba, M. L., Susana Sáez, J., del Monaco, S., Lopes, C. A., et Sangorrín, M. P. (2016). TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspota delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 217, 94–100.
- Vinay, M., Franche, N., Grégori, G., Fantino, J.-R., Pouillot, F., et Ansaldi, M. (2015). Phage-based fluorescent biosensor prototypes to specifically detect enteric bacteria such as *E. coli* and *Salmonella enterica* Typhimurium. *PLoS ONE* 10.
- Wakisaka, A., et Ohki, T. (2004). Phase separation of water–alcohol binary mixtures induced by the microheterogeneity. *Faraday Discuss* 129, 231–245.
- Wallner, G., Amann, R., et Beisker, W. (1993). Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14, 136–143.

- Walther, A., Hesselbart, A., et Wendland, J. (2014). Genome sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the World's First Pure Culture Lager Yeast. *G3 GenesGenomesGenetics* 4, 783–793.
- Wang, A., Chen, L., Pu, K., et Zhu, Y. (2014a). Identification of stem-like cells in non-small cell lung cancer cells with specific peptides. *Cancer Lett.* 351, 100–107.
- Wang, B., Wang, Q., Cai, Z., et Ma, M. (2015). Simultaneous, rapid and sensitive detection of three food-borne pathogenic bacteria using multicolor quantum dot probes based on multiplex fluoroimmunoassay in food samples. *LWT - Food Sci. Technol.* 61, 368–376.
- Wang, C., Esteve-Zarzoso, B., et Mas, A. (2014b). Monitoring of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, and *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) populations during alcoholic fermentation by fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Food Microbiol.* 191, 1–9.
- Watanabe, M., et Lino, S. (1984). Studies on bacteria isolated from Japanese wines. *Part 2*, 13–22.
- West, J. L., et Halas, N. J. (2000). Applications of nanotechnology to biotechnology: Commentary. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 215–217.
- Willenburg, E., et Divol, B. (2012). Quantitative PCR: An appropriate tool to detect viable but not culturable *Brettanomyces bruxellensis* in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 160, 131–136.
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741.
- Winniczuk, P. P., et Parish, M. E. (1997). Minimum inhibitory concentrations of antimicrobials against micro-organisms related to citrus juice. *Food Microbiol.* 14, 373–381.
- Xu, F., Pellino, A. M., et Knoll, W. (2008). Electrostatic repulsion and steric hindrance effects of surface probe density on deoxyribonucleic acid (DNA)/peptide nucleic acid (PNA) hybridization. *Thin Solid Films* 516, 8634–8639.
- Xu, H. S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J., et Colwell, R. R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* 8, 313–323.
- Xufre, A., Albergaria, H., Inácio, J., Spencer-Martins, I., et Gírio, F. (2006). Application of fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 376–384.
- Yakobson, C. M. (2009). Pure culture fermentation characteristics of *Brettanomyces* yeast species and their use in the brewing industry. *Sch. Life Sci. Heriot-Watt Univ. Edinb.*
- Yamada, Y. (2000). Transfer of *Acetobacter oboediens* Sokollek et al 1998 and *Acetobacter intermedius* Boesch et al. 1998 to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter*

- oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 2225–2227.
- Yamada, Y. (2016). “Systematics of Acetic Acid Bacteria,” in *Acetic Acid Bacteria*, eds. K. Matsushita, H. Toyama, N. Tonouchi, et A. Okamoto-Kainuma (Tokyo: Springer Japan), 1–50.
- Yamada, Y., et Yukphan, P. (2008). Genera and species in acetic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 15–24.
- Yamada, Y., Hoshino, K., et Ishikawa, T. (1997). The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1244–1251.
- Yamada, Y., Hosono, R., Lisdyanti, P., Widyastuti, Y., Saono, S., Uchimura, T., et al. (1999). Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45, 23–28.
- Yamaguchi, T., Kawakami, S., Hatamoto, M., Imachi, H., Takahashi, M., Araki, N., et al. (2015). *In situ* DNA-hybridization chain reaction (HCR): a facilitated *in situ* HCR system for the detection of environmental microorganisms. *Environ. Microbiol.* 17, 2532–2541.
- Yap, A., Jiranek, V., Grbin, P., Barnes, M., et Bates, D. (2007). Studies on the application of high-power ultrasonics for barrel and plank cleaning and disinfection. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 22(3):96-104
- Yukphan, P., Malimas, T., Muraoka, Y., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., et al. (2011). *Neokomagataea* gen. nov., with descriptions of *Neokomagataea thailandica* sp. nov. and *Neokomagataea tanensis* sp. nov., osmotolerant acetic acid bacteria of the α -Proteobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75, 419–426.
- Zahoor, T., Siddique, F., et Farooq, U. (2006). Isolation and characterization of vinegar culture (*Acetobacter aceti*) from indigenous sources. *Br. Food J.* 108, 429–439.
- Zaldivar, J., et Ingram, L. O. (1999). Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnol. Bioeng.* 66, 203–210.
- Zott, K., Claisse, O., Lucas, P., Coulon, J., Lonvaud-Funel, A., et Masneuf-Pomarede, I. (2010). Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. *Food Microbiol.* 27, 559–567.
- Zuehlke, J. M., et Edwards, C. G. (2013). Impact of sulfur dioxide and temperature on culturability and viability of *Brettanomyces bruxellensis* in wine. *J. Food Prot.* 76, 2024–2030.

Annexes

Annexe 1

- la méthode Ausubel (Ausubel et al., 1992) adaptée
 - centrifuger 1 mL d'échantillon à 12 000 g durant 5 min
 - Resuspendre le culot dans 567 μ L de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM disodium EDTA, pH 8.0), 30 μ L de SDS 10% et 3 μ L de protéinase K à 20 mg/mL ont été ajoutés
 - incuber 1 h à 37°C
 - ajouter 100 μ L de solution NaCl à 5 M et agiter minutieusement
 - ajouter 80 μ L de solution CTAB/NaCl (10% CTAB dans 0.7M NaCl), agiter et incuber 10 min à 65°C
 - extraire l'ADN avec un volume équivalent de chloroforme/alcool isoamylique, puis centrifuger 5 min
 - transférer le surnageant aqueux dans un nouveau tube. Extraire l'ADN avec un volume identique de phénol/chloroforme/alcool isoamylique. Centrifuger 5 min.
 - transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube. Extraire l'ADN avec 0,6 volume d'isopropanol. Laver le précipité avec de l'éthanol à 70%. Centrifuger et jeter le surnageant et sécher brièvement le culot d'ADN.
 - Resuspendre le culot dans 50 μ L d'eau pure.

Annexe 2

- la méthode Lipp (Lipp et al., 1999) adaptée
 - 1 mL d'échantillon centrifugé à 12 000 g durant 5 min
 - Ajouter 300 µL d'eau pure, 500 µL de tampon CTAB (20 g/L CTAB, 1.4M NaCl, 0.1M Tris/HCl, 20 mM EDTA), 20 µL de protéinase K à 20 mg/mL et incubé à 57°C durant 60 min
 - Centrifuger 10 min à 16 000 g
 - Transférer le surnageant dans un tube contenant 500 µL de chloroforme
 - Centrifuger 10 min à 16 000 g
 - Transférer 600 µL de la couche supérieure dans un nouveau tube contenant 500 µL de chloroforme
 - Centrifuger 5 min à 16 000 g
 - Transférer 550 µL de la couche supérieure dans un nouveau tube
 - Ajouter 2 volumes de solution de précipitation au CTAB (5 g/L CTAB, 0,04 M NaCl)
 - Incuber 60 min à température ambiante
 - Centrifuger 5 min à 16 000 g
 - Dissoudre le précipité dans 350 µL de NaCl (1,2 M)
 - Ajouter 350 µL chloroforme et mélanger 30 s
 - Centrifuger 10 min à 16 000 g
 - Transférer 350 µL de la couche supérieure dans un nouveau tube
 - Ajouter 0,6 volume d'isopropanol et mélanger
 - Centrifuger 10 min à 16 000 g
 - Ajouter 500 µL d'éthanol 70% et mélanger délicatement
 - Centrifuger 10 min à 16 000 g
 - Jeter le surnageant et ajouter 50 µL d'eau pure.

Résumé

Les nouvelles pratiques utilisées pour l'élaboration du vin amènent à une recrudescence des altérations microbiennes. C'est pourquoi, de nouvelles méthodes doivent être développées afin de quantifier ces microorganismes de façon précise, rapide et avec de faibles coûts. Les principales altérations du vin sont dues aux bactéries acétiques (BA) (*A. aceti*, *A. pasteurianus*, *G. oxydans* et *Ga. liquefaciens*) et à *Brettanomyces bruxellensis*. Par l'action d'enzymes, les 1^{ères} transforment l'éthanol en acide acétique alors que *B. bruxellensis* transforme les acides hydroxycinnamiques en éthyles phénols (EP) (molécules odorantes désagréables). La cytométrie en flux couplée à la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence a tout d'abord été étudiée. Aucun résultat reproductible n'a été développé pour les BA en vin rouge alors que pour *B. bruxellensis*, le protocole existant a été amélioré avec une quantification possible en 18 h. La PCR en temps réel a également été utilisées afin de quantifier ces microorganismes. Un protocole a été développé pour la quantification des BA en vin rouge (10^3 cellules/mL) avec l'utilisation d'un témoin interne microbiologique permettant de valider le rendement de l'extraction de l'ADN. Pour *B. bruxellensis*, trois kits commerciaux ont été analysés lors d'une étude interlaboratoires. Les quantifications se sont révélées significativement différentes des énumérations sur boîte de Pétri avec une quantification des cellules mortes. De plus, il a été étudié et validé l'effet population de *B. bruxellensis* sur l'efficacité du SO₂. Il ressort également de ces expérimentations que les cellules en état viable mais non cultivable ne produisent pas d'EP.

Abstract

New practices used to elaborate wine lead to an increase of wine spoilage due to microorganisms. That is why, new technics have to be developed to quantify these microorganisms accurately, quickly and with low costs. The main wine spoilages are due to acetic acid bacteria (AAB) (*A. aceti*, *A. pasteurianus*, *G. oxydans* and *Ga. liquefaciens*) and *Brettanomyces bruxellensis* development. AAB transforms ethanol to acetic acid while *B. bruxellensis* transforms hydroxycinnamic acids to ethyl phenols (EP) (unpleasant odor molecules). In order to detect these wine spoilage microrganisms, flow cytometry coupled to fluorescent *in situ* hybridization has been assessed. No reproducible results have been developed for AAB in red wine while for *B. bruxellensis*, the existing protocol has been improved with a possible quantification after 18 h compared to 48-72 h in the previous protocol. The real-time PCR was also used to quantify these microorganisms. A protocol has been developed for the AAB quantification in red wine (10^3 cells/mL) with the use of a microbiological internal control to validate the DNA yield after extraction. For *B. bruxellensis*, three commercial kits were analyzed in an interlaboratory study. Quantifications were significantly different to the enumerations by Petri dish, with dead cell quantifications. Moreover, we demonstrated that the effectiveness of sulfite is dependent of the *B. bruxellensis* population. It also appears from these experiments that cells in viable but not culturable state do not produce EP.