

DETECCION DE BRETTANOMYCES Y CORRELACION CON LAS REPERCUSIONES SENSORIALES

A. Costantini; M. C. Cravero; M. Cersosimo; M.C. Pazo-Alvarez; V. Del Prete; E. Vaudano; F. Bonello; E. Garcia-Moruno

CRA-Istituto Sperimentale per l'Enologia, Via Pietro Micca 35, 14100 Asti (Italia)

e.garciamoruno@isenologia.it

RESUMEN

La contaminación del vino, en particular del vino tinto, debido a levaduras del género *Brettanomyces* es actualmente uno de los problemas de mayor relieve en el sector enológico. Estas levaduras son muy resistentes y tienen la capacidad de crecer incluso en presencia de escasas cantidades de nutrientes.

Brettanomyces puede sobrevivir en todas las superficies de la bodega y es responsable de la formación de etil fenoles, que pueden ocasionar aromas desagradables a menudo descritos como “fenólico”, “animal”, “cuero” o “solvente”.

Para prevenir el desarrollo de esta levadura durante la vinificación, es necesario disponer de métodos que permitan en tiempo real la determinación de la presencia del microorganismo. Con los modernos métodos de la biología molecular se pueden detectar en el vino concentraciones de pocas células (10 cell/mL) de *Brettanomyces*, con lo cual se puede intervenir rápidamente para limitar su crecimiento, de la manera más adecuada según el tipo de vino.

SUMMARY

Wine contamination, especially in red wine, caused by yeast belonging to the genus *Brettanomyces* is actually one of the most important problem in enological field. This yeast is very resistant and it is able to grow in media with a few of nutrient substances.

Brettanomyces/Dekkera is a common contaminating yeast. It can survive on all winery surfaces and it is responsible of ethyl phenols compounds formation that cause unpleasant aromas often described as “phenolic”, “animal”, “leather” and “solvent”.

To prevent the development of these yeasts during winemaking is necessary to have methods that are able to detect in real time the presence of this microorganisms. The recent molecular biology techniques allow to detect very low concentration of this yeast in wine (10 cells/mL); in this way it is possible to quickly operate and take decisions on wine processing.

INTRODUCCION

Levaduras del genero *Brettanomyces* se encontraron por primera vez al inicio del siglo XX, en la fermentación secundaria de algunas cervezas en Inglaterra y posteriormente, hacia mediados del siglo, se aisló una cepa en un vino espumoso en Alemania (Claussen, 1903; Larue *et al.*, 1991; Licker *et al.*, 1998). Desde entonces se han publicado numerosos trabajos sobre la presencia y los efectos que produce esta levadura en mostos y vinos de todo el mundo (Larue *et al.*, 1991; Chatonnet *et al.*, 1995; Licker *et al.*, 1998; Gerbaux *et al.*, 2000; Cocolin *et al.*, 2004).

Las levaduras *Brettanomyces* son capaces de adaptarse a diversas situaciones y se las puede encontrar en la linfa de los árboles, en el terreno, en el agua y en el aire. En bodega, además de en el vino, han sido aisladas en las vascas, en las tuberías, en las paredes, en el suelo y en los recipientes de roble. La contaminación se manifiesta normalmente al final de la fermentación alcohólica o maloláctica y sobre todo durante el envejecimiento en barrica (Chatonnet *et al.*, 1993; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Silva *et al.*, 2004).

Estas levaduras crecen bastante despacio (desde algunas semanas a diversos años) con temperatura óptima de crecimiento entre 13 y 30 °C y presentan una buena resistencia a la acidez, al sulfuroso y al alcohol (Gerós *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2004). Desde un punto de vista organoléptico su desarrollo contribuye a la aparición en el vino de particulares olores, casi siempre desagradables, definidos como sudor de caballo, establo, cuero, plástico quemado, barniz o solvente, capaces de enmascarar los aromas afrutados y florales del vino y como consecuencia de disminuir su calidad. Estos olores están relacionados, por lo menos en parte, con la formación de 4-etil fenol y 4-etil guaiacol a partir de los ácidos hidroxicinámicos de la uva (Chatonnet *et al.*, 1992; Licker *et al.*, 1998).

Hasta ahora no se ha encontrado un método eficaz para impedir completamente el desarrollo de *Brettanomyces* en el vino, pero se han hecho muchos estudios para limitar su acción, por ejemplo algunos autores proponen mantener el pH por debajo de 3,5 y una buena concentración de sulfuroso durante la fermentación y el envejecimiento (Chatonnet *et al.*, 1993; Arvik e Henick-Kling, 2002). Sin embargo, *Brettanomyces* resiste incluso a altas concentraciones de sulfuroso introduciéndose en los fragmentos porosos de la madera y con ningún tratamiento, ni con agua sulfitada, ni con ozono o mediante rascado o tostación, es posible esterilizar una barrica contaminada por *Brettanomyces* (Henick-Kling *et al.*, 2000; Cersosimo *et al.*, 2005). Recientemente algunos autores (du Toit *et al.*, 2005; Garcia-Moruno *et al.*, 2006) han indicado la posibilidad de que estos microorganismos se encuentren en ciertas ocasiones en un estado vital pero no cultivable (VBNC). Este estado, muy estudiado en las bacterias, sobre todo del suelo, ha sido definido por Oliver (1999) como un estado en el cual la célula no crece en los medios convencionales de cultivo formando una colonia, aunque de hecho sea una célula viva. Las células que utilizan este mecanismo para sobrevivir en condiciones de stress, pueden salir de este estado cuando las condiciones del medio cambian.

Desde un punto de vista aplicativo, para controlar el crecimiento de *Brettanomyces* en la bodega y poder intervenir rápidamente es fundamental disponer de métodos de detección en tiempo real. Con los métodos de la microbiología clásica no siempre se obtienen resultados y además tienen el inconveniente de la lentitud, por lo tanto el método de control más utilizado hasta ahora en las bodegas se ha basado casi siempre en el análisis químico de los fenóles volátiles. El problema de esta determinación es que cuando estos compuestos aparecen en el vino ya es tarde para prevenir el desarrollo de *Brettanomyces*. Los modernos métodos de la biología molecular permiten sin embargo no solo la detección de la contaminación cuando en

el vino están presentes pocas células del microorganismo sino también la posibilidad de cuantificarlas y determinar el grado de crecimiento. Con esta información es posible intervenir rápidamente, de la manera más adecuada según el tipo de vino. Además estos métodos son independientes de la obtención de colonias en una placa Petri, se pueden utilizar extrayendo directamente el ADN a partir del vino.

Resulta también muy importante, para programar distintas intervenciones en la bodega, conocer la cantidad de etil fenoles que un vino puede contener sin que se vean comprometidas sus cualidades organolépticas. Como se sabe el umbral de percepción de los etil fenoles es muy diferente según el tipo de vino (Chatonnet *et al.*, 1992; Fugelsang *et al.*, 2003; Alessandria *et al.*, 2005 ; Garcia-Moruno *et al.*, 2006).

TECNICAS BIOMOLECULARES PARA LA DETECCION DE *BRETTANOMYCES* EN EL VINO

Extracción del ADN

La extracción del ADN se realiza a partir de 2 ml de vino, que son centrifugados a 10000 rpm durante 5 min. El ADN de los pellet residuos de la centrifugación se extrae utilizando el kit EZNA de Omega Biotec, que permite obtener un ADN de un elevado grado de pureza.

PCR cualitativa

Para determinar la presencia o ausencia de *Brettanomyces* en las muestras de vino se utiliza un método de amplificación del ADN cualitativo. Los oligos utilizados han sido descritos por Phister y Mills (2003). Estos primers han sido diseñados sobre la subunidad 26S del rRNA . El producto de amplificación es de 95 bp. Otros primers han sido diseñados en nuestro Instituto sobre la secuencia específica para el *Brettanomyces*. El producto de amplificación es de 196 bp.

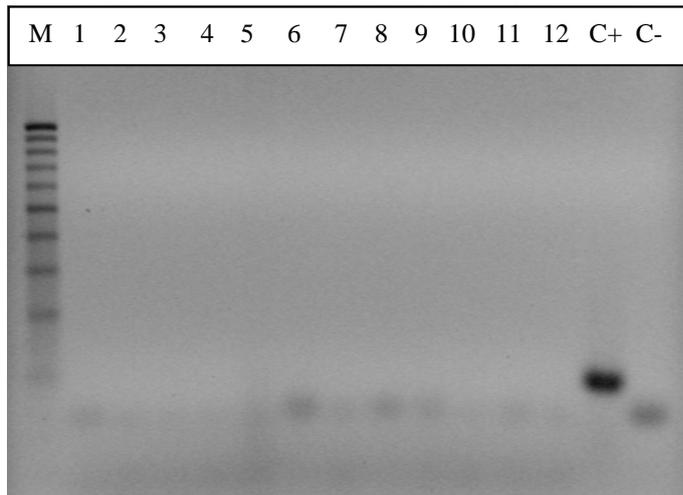
La mezcla de reacción es: 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 2X tampón de reacción, 0,4 µM de cada primer, 1 µL de ADN, 0,2 U de Taq polimerasa (Invitrogen). El programa de temperatura es: 30 sec a 95 °C, 30 sec a 63 °C, 45 sec a 72 °C, todo repetido durante 45 ciclos.

Los productos de amplificación resultantes se analizan por electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% (w/v) en tampón TAE (40mM Tris- Acetato y 1mM EDTA pH 8). El gel se coloca en una solución de bromuro de etidio y se visualiza bajo luz UV con GelDoc (Biorad).

La mínima cantidad de *Brettanomyces* que se puede detectar con este método es de 10³ cell/ml.

En la fig. n. 1 se puede ver un ejemplo del gel de electroforesis obtenido en la amplificación del ADN de varias muestras de vino.

Fig.1. Electroforesis en gel de agarosa 2,5%



M: marker low range (Sigma); 1-12: ADN extraídos de diversas muestras de vino
C+: ADN de *Brettanomyces bruxellensis*; C-: control negativo

PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa (Real time PCR), permite determinar el número de células de *Brettanomyces* presentes en el vino. Se utilizan los mismos oligos que en la PCR cualitativa y para evaluar la especificidad de los productos de amplificación se analizan las curvas de melting. La mezcla de reacción (25 μ L) contiene: iQ Sybr green supermix Biorad, 1 μ L de ADN, 0,2 μ M oligonucleotidos (primers).

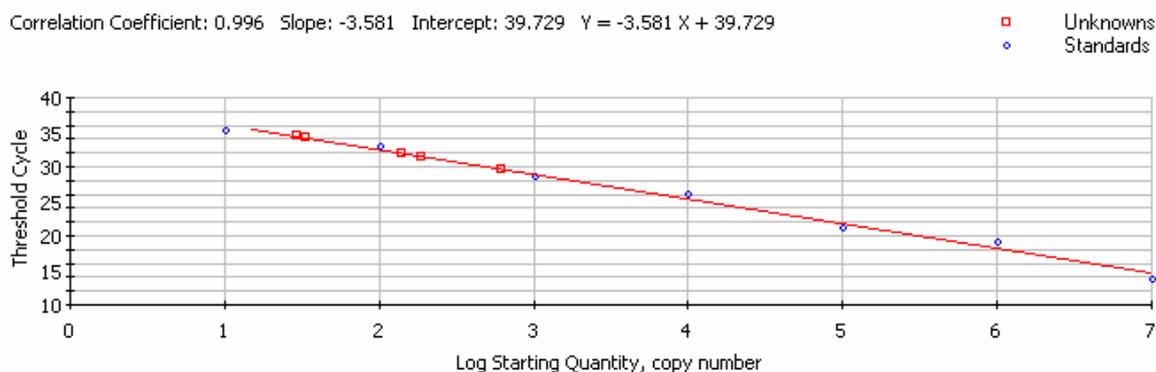
El aparato utilizado ha sido el iQcycler Biorad. El programa de temperatura es: una etapa inicial de 5 min a 95 $^{\circ}$ C, 45 ciclos con 1 min a 95 $^{\circ}$ C, 45 sec a 69 $^{\circ}$ C y 7 sec a 72 $^{\circ}$ C. La sensibilidad del método es de 10 cell/ml.

La calibración se ha realizado de la siguiente manera: Una cepa de *Brettanomyces bruxellensis* de la colección del Instituto Sperimentale per l'Enologia (ISE 371) se inocula en terreno líquido YEPG (1% peptona, 2% glucosio, 1% extracto de levadura) y se incuba a 25 $^{\circ}$ C.

A partir de este cultivo se inocula en concentración de 10^7 cell/ml un vino precedentemente esterilizado con filtro de 0,2 μ m. Del vino inoculado se hacen diversas diluciones hasta llegar a la mínima de 10 cell/ml. De cada uno de los vinos inoculados con *Brettanomyces* en el margen de concentraciones de 10 a 10^7 cell/ml se toman 2 ml, a partir de los cuales se extrae el DNA, como descrito precedentemente. Las extracciones se han realizado por triplicado.

En la figura 2 se presenta la determinación de la eficiencia de amplificación y el límite de detección de *Brettanomyces bruxellensis* con la Real Time PCR.

Fig. 2: Curva de calibración obtenida con PCR cuantitativa para la determinación de *B. bruxellensis*



TECNICAS BIOMOLECULARES PARA LA CARACTERIZACION DE LA ESPECIE *BRETTANOMYCES*

La identificación taxonómica de las levaduras del vino ha sido y es todavía objeto de muchos trabajos de investigación. Los métodos fenotípicos, basados en las características morfológicas y fisiológicas, tradicionalmente usados en la sistemática, se combinan hoy con técnicas de biología molecular. En los últimos años se han desarrollado y aplicado diversas metodologías que se basan en el polimorfismo del DNA.

En la actual clasificación el género *Brettanomyces*, forma no esporógena del género *Dekkera*, comprende 5 especies y de estas el *Brettanomyces bruxellensis* es la especie que se encuentra más frecuentemente en el vino (Kurtzman e Fell, 1998; Henick-Kling *et al.*, 2000).

Analisis PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Se amplifican las regiones ITS utilizando los oligos ITS1 y ITS4 (Guillaumon *et al.*, 1998), complementarios de dos secuencias conservadas del gen rRNA.

La reacción se lleva a cabo en un volumen final de 20 μ l, utilizando la siguiente mezcla: 0.4 mM de cada oligo, 1U de Taq- DNA polimerasa, 2 mM $MgCl_2$, 0.4 mM dNTPs, 1X tampón de reacción. El programa de temperatura es de 35 ciclos a 94°C durante 1 min, 55°C durante 1 min y 72°C durante 2 min. Esta reacción se puede utilizar sea con el ADN extraído que directamente con las células de una colonia.

Los productos amplificados son tratados con las endonucleasas de restricción HinfI (Roche Diagnostic) y HaeIII (Sigma) de acuerdo con las indicaciones de los productores. Para separar los productos resultantes se utiliza un gel de agarosa al 2.5% (w/v) en tampón TAE (40mM Tris- Acetato y 1mM EDTA pH 8). El gel se coloca en una solución de bromuro de etidio y se visualiza bajo luz UV.

Analisis RAPD (Random Amplified Length Polymorphism)

Las reacciones de amplificación se llevan a cabo en un volumen final de 20 µl que contiene: 1 µM oligo OPB-15 (MWG, Germany), 5.0 mM MgCl₂, 4.0 mM dNTPs, 1X tampón de reacción, 2.5 U Taq-DNA polimerasa (Invitrogen) y 50 ng de ADN.

El programa de temperatura es: 1 min a 95°C, 1 min a 36°C, 2 min a 72°C, repetido durante 45 ciclos; y una etapa final de 5 min a 72 °C (Welsh *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1990).

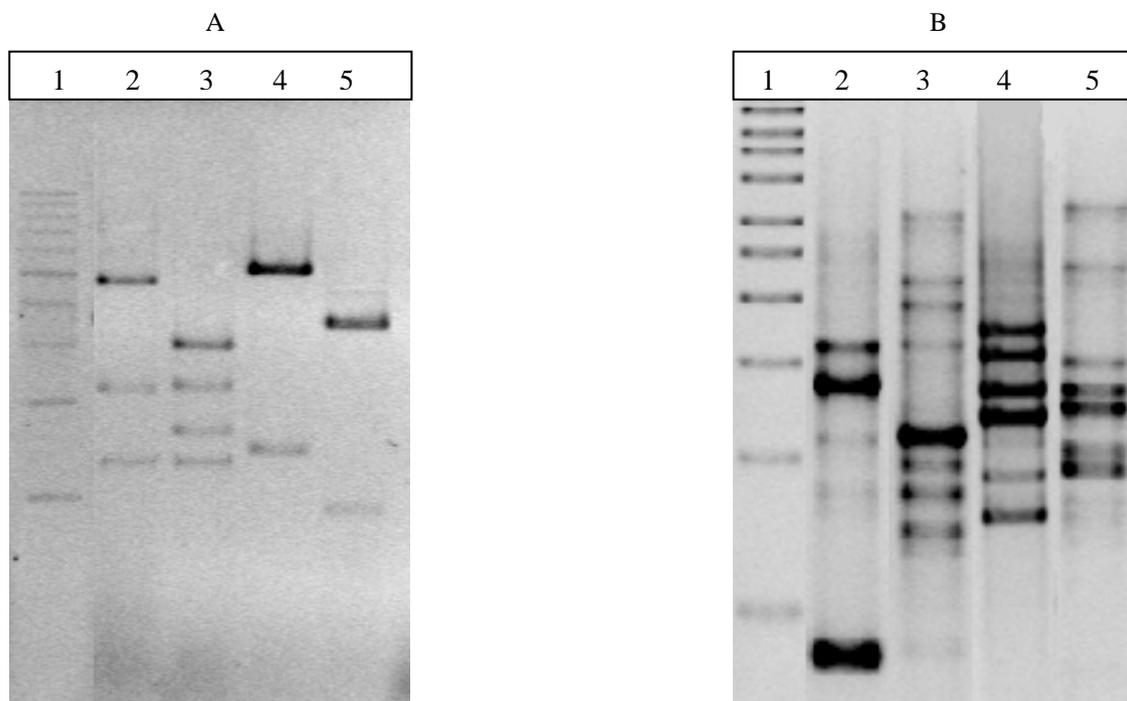
El oligo OPB-15 es un pequeño oligonucleotido, cuya secuencia arbitraria se ibrida a bajas temperaturas con las secuencias complementarias distribuidas casualmente en el genoma.

Para separar los productos de amplificación resultantes se utiliza un gel de agarosa al 2.5% (w/v) en tampón TAE (40mM Tris- Acetato y 1mM EDTA pH 8). El gel se coloca en una solución de bromuro de etidio y se visualiza bajo luz UV.

En el análisis RAPD la elección del oligonucleotido es muy importante para el poder discriminante del método. Nosotros hemos probado muchos oligos y con el OPB-15 se obtiene la mejor resolución, el perfil de bandas que se obtiene es muy polimórfico y permite una clara diferenciación de las especies de levaduras enológicas.

Estos dos métodos proporcionan perfiles específicos y demuestran ser métodos sencillos y fáciles de realizar para identificar la población de levaduras durante la vinificación. En la figura 3 (Garcia-Moruno *et al.*, 2006), se muestra un ejemplo de los perfiles obtenidos con 5 levaduras distintas con las dos técnicas.

Fig. 3: Identificación de especies de levadura



A) RFLP con HaeIII, B) RAPD con OPB-15. 1) marker (Sigma); 2) *S. bayanus*; 3) *S. cerevisiae*; 4) *Schizosaccharomyces japonicus*; 5) *Brettanomyces bruxellensis*

PERCEPCION SENSORIAL DEL CARACTER BRETT EN VINO DOLCETTO

Se utilizó un grupo de 14 catadores expertos, 4 hombres y 10 mujeres, de edad comprendida entre 28 y 49 años. Se han calculado los umbrales individuales y de grupo de los catadores (best estimate threshold; BET) mediante test triangulares según el método de Kluba *et al.*, (1993).

Se prepararon soluciones de vino Dolcetto con las siguientes concentraciones de etil fenoles:

4-etil fenol ($\mu\text{g/L}$): 81,9 – 163,96 – 245,00 – 409,9 – 819,8 – 1639,6 – 2459,4

4-etil guaiacol ($\mu\text{g/L}$): 41,8 – 83,65 – 125,47 – 209,12 – 334,56 – 418,24 – 627,36

mezcla de los dos ($\mu\text{g/L}$):

I: 163,96 etil fenol; 41,8 etil guaiacol

II: 491,88 etil fenol; 125,47 etil guaiacol

III: 1311,68 etil fenol; 334,56 etil guaiacol

IV: 1639,6 etil fenol; 418,24 etil guaiacol

Las muestras de vino Dolcetto con distintas concentraciones de la mezcla de etil fenoles se analizaron por parte del grupo de catadores con el test del ordenamiento: los vinos tenían que ser ordenados en función de la intensidad del aroma afrutado, especiado y vegetal y por la preferencia olfativa, del menos intenso al más intenso y del menos agradable al más agradable. A los catadores se les preguntó también si identificaban algún otro olor y de ordenar las muestras en base a la intensidad de este olor, del menos intenso al más intenso. Los resultados se han elaborado con el test de Friedman ($p=95\%$) (Conover, 1980).

Tabla 1: umbrales olfativos en vino Dolcetto obtenidos con test triangulares y cálculo del BET (best estimate threshold)

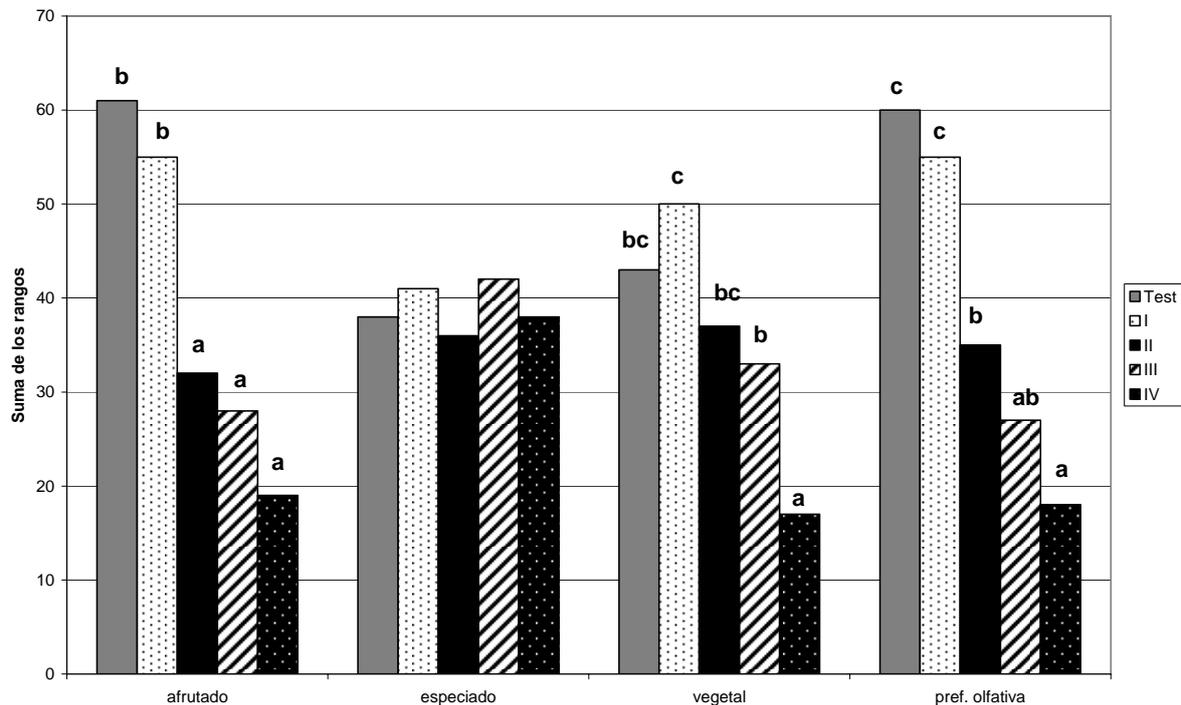
	4-etil fenol ($\mu\text{g/L}$)	4-etil guaiacol ($\mu\text{g/L}$)
umbral de percepción	119,2	151,6
umbral de reconocimiento	266,9	No reconocido

En mezcla 4 etil fenol: 4-etil guaiacol (4:1)

	4-etil fenol ($\mu\text{g/L}$)	4-etil guaiacol ($\mu\text{g/L}$)	Suma ($\mu\text{g/L}$)
umbral de percepción	171,1	43,8	214,9
umbral de reconocimiento	312,7	79,8	392,5

El 4-etil guaiacol presenta aromas especiados que pueden explicar que no se haya reconocido en el test, es decir, los catadores han notado la diferencia pero no la han reconocido como un defecto, atribuyendo el distinto olor a una mayor intensidad del olor especiado. En el caso de la mezcla, la presencia de etil guaiacol hace aumentar el umbral de reconocimiento del 4-etil fenol, con lo cual se puede pensar que el reconocimiento del defecto está relacionado con la presencia de 4-etil fenol y no de 4-etil guaiacol.

Figura 4: Test del ordenamiento de los vinos con etil fenoles para los descriptores olfativos afrutado, especiado, vegetal y preferencia olfativa



Datos elaborados con el test de Friedman: letras distintas indican diferencias significativas al 95%. Test= vino testigo, sin etil fenoles; I=163,96 µg/L etil fenol; 41,8 µg/L etil guaiacol; II= 491,88 µg/L etil fenol; 125,47 µg/L etil guaiacol; III= 1311,68 µg/L etil fenol; 334,56 µg/L etil guaiacol; IV=1639,6 µg/L etil fenol; 418,24 µg/L etil guaiacol.

El vino testigo, sin etil fenoles ha resultado estadísticamente diverso de los vinos II, III y IV, pero no del vino I. Como se ve en la fig. 1 los vinos han resultado estadísticamente diferentes en relación al aroma afrutado y vegetal y en relación a la preferencia olfativa, mientras que no se han percibido diferencias a nivel de aroma especiado. Aún en las concentraciones más altas de etil fenoles los vinos no han sido reconocidos como diversos para este descriptor.

En el caso del aroma vegetal, el vino testigo se distingue solo del vino con la mayor concentración de etil fenoles. Este vino (IV) se reconoce como significativamente diverso de todos los otros; la disminución del olor vegetal se puede explicar considerando la disminución de los aromas típicos del vino debido a la presencia de defectos que se pueden atribuir a los etil fenoles (no con una relación directa con la presencia de estos compuestos, sino con la disminución de los aromas del vino y de consecuencia con la mayor percepción de los defectos que se pueden atribuir a los etil fenoles).

Si se observa la evaluación del aroma del vino en su conjunto se puede observar que sigue una distribución similar a la disminución del aroma afrutado.

PUNTOS CRITICOS PARA EL CONTROL DURANTE LA VINIFICACION Y CONCLUSIONES FINALES

Para controlar la proliferación de *Brettanomyces* en bodega y prevenir la posible alteración sensorial del vino se puede aplicar el siguiente protocolo:

Análisis con PCR cualitativa hacia el final de la fermentación alcohólica, repetido periódicamente cada 4 días hasta que no comienza la fermentación maloláctica. Si el resultado es positivo, utilizar la Real Time PCR para cuantificar el número de células y verificar si hay crecimiento. Hay que tener presente, para programar las distintas operaciones de bodega, que *Brettanomyces* empieza a producir etil fenoles a nivel de trazas (menos de 10 µg/L) cuando la población celular es del orden de 1×10^4 cell/mL.

Si el resultado al final de la fermentación alcohólica es negativo y la fermentación maloláctica empieza sin problemas, se puede esperar hasta el final de la maloláctica para efectuar una nueva PCR cualitativa. Durante la conservación del vino se pueden realizar análisis periódicos, con intervalos que dependerán del riesgo asociado a las condiciones de conservación y a las características de la bodega.

En las operaciones de bodega para controlar el crecimiento de *Brettanomyces* hay que tener en cuenta el tipo de vino, una cierta cantidad de etil fenoles no tiene por qué ser negativa si está por debajo del umbral de reconocimiento y este depende del vino.

Bibliografía

Arvik T., Henick-Kling T. 2002. *Brettanomyces bruxellensis* occurrence, growth, and effect on wine flavour. 31st Annual New York Wine Industry Workshop: 117-122.

Cersosimo M., Del Prete V., Pagliara A., Garcia Moruno E. 2005. Effetto del trattamento con ozono sulla contaminazione di *Brettanomyces* in barrique. *L'Enologo* 5: 105-108.

Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J.N. 1992. Le caractère phénolé des vins rouges: caractérisation, origine et moyens de lutte. *Rev. Fr. Oenol.* 138: 21-24.

Chatonnet P., Boidron J.N., Dubourdieu D. 1993. Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur leur teneur en acide acétique et éthyl-phénols. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 27: 277-298.

Chatonnet P., Dubourdieu D., Boidron J.N. 1995. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeast and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46: 463-468.

Claussen N.H. 1903. Improvements in and connected with the manufacture of English beers or malt liquors and in the production of pure yeasts cultures for use therein. *Eng. Pat.* 28: 184.

Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Zironi R., Comi G. 2004. Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalus* in spoiled wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (3): 1347-1355.

Conover W.J. 1980. Practical Nonparametric Statistics. John Willey and Sons, New York



du Toit W.J., Pretorius I.S., Lonvaud-Funel. 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. of Applied Microb.* 98: 862-871.

Fugelsang K.C., Zoecklein B.W. 2003. Population Dynamics and Effects of *Brettanomyces bruxellensis* Strains on Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 54 (4): 294-300.

Garcia-Moruno E., Cersosimo M., M.C. Cravero M. C., Pazo Alvarez M.C., Borsa D., Del Prete V. 2006. Comportement de *Brettanomyces/Dekkera* dans différentes conditions ambiantes: Aspects microbiologiques et sensoriels. XXIXth World Congress of Vine and Wine. Logroño (Spain) 25-30 Giugno 2006, vol. 2: 203.

Garcia-Moruno E., Costantini A., Vaudano E. Identification of yeast species from wine by RFLP and RADP techniques. XXIXth World Congress of Vine and Wine. Logroño (Spain) 25-30 Giugno 2006, vol.2: 72.

Gerbaux V., Jeudy S., Monamy C. 2000. Étude des phenols volatils dans les vins de Pinot noir en Bourgogne. *Bulletin de l'OIV*. 835-836: 582-599.

Gerós, H., Cássio F., Leão C. 2000. Utilization and transport of acetic acid in *Dekkera anomala* and their implications on the survival of the yeast in acidic environments. *J. Food Prot.* 63: 96-101.

Guillaumon J. M., Sabatè J., Barrio E., Cano J., Querol A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of ribosomal ITS regions. *Arch. Microbiol.* 169: 387-392.

Henick-Kling T., Egli C., Licker J., Mitrakul C., Acree T.E. 2000. *Brettanomyces* in Wine, in Fifth International Symposium on Cool Climate Viticulture & Oenology, Melbourne, Australia: 16-20.

Kluba R., Chairman N., de Banchs N., Fraga A., Jansen G., Langstaff S., Meilgaard M., Nonaka R., Thompson S., Verhagen L., Word K., Crumplen R. 1993. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 51: 181-185.

Kurtzman C.P. e Fell J. W. 1998. "The yeast: a taxonomic study"; Forth Edition, Elsevier.

Larue F., Rozes N., Froudiere I., Couty C., Perreira G.P. 1991. Incidence du développement de *Dekkera/Brettanomyces* dans les mouts et les vins. *J. Int. Sciences vigne vin.* 25: 149-155.

Licker J.L., Acree T.E., Henick- Kling T. 1998. What is "Brett" (*Brettanomyces*) flavor? Chemistry of Wine Flavor, A. L. Waterhouse and S. E. Ebeler, eds, ACS symposium series, 714: 96-115.

Loureiro V.M., Malfeito-Ferreira M. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food. Microbiol.* 86: 23-50.

Oliver, J. D. 1999. The viable but nonculturable state and cellular resuscitation. *In To grow or not to grow: nonculturability revisited.* C. R. Bell, M. Brylinsky, and P. Johnson-Green (eds.), Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology, Halifax, Canada.

Phister T.G., Mills D.A. 2003. Real-Time PCR Assay for Detection and Enumeration of *Dekkera bruxellensis* in Wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 12: 7430-7434.



Silva P., Cardoso H., Gerós H. 2004. Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. *Am. J. Enol. Vitic.* 55: 65-72.

Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research.* 18 (24): 7213-7218.

Williams John G.K., Kubelik Anne R., Kenneth J. Livak, Rafalski J. Antoni, Tingey Scott V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research.* 18 (22): 6531-6535.