

Evaluation du risque des *Brettanomyces* non cultivables dans un vin rouge

Anne-Claire SILVESTRI, CHANGINS, Haute Ecole de viticulture et œnologie, 1260 Nyon

Renseignements: anne-claire.silvestri@changins.ch, tél. +41 22 363 40 38, www.changins.ch

Tiré du travail de thèse de Bachelor de Valentine Fesselet (étudiante HES 2014–2016)

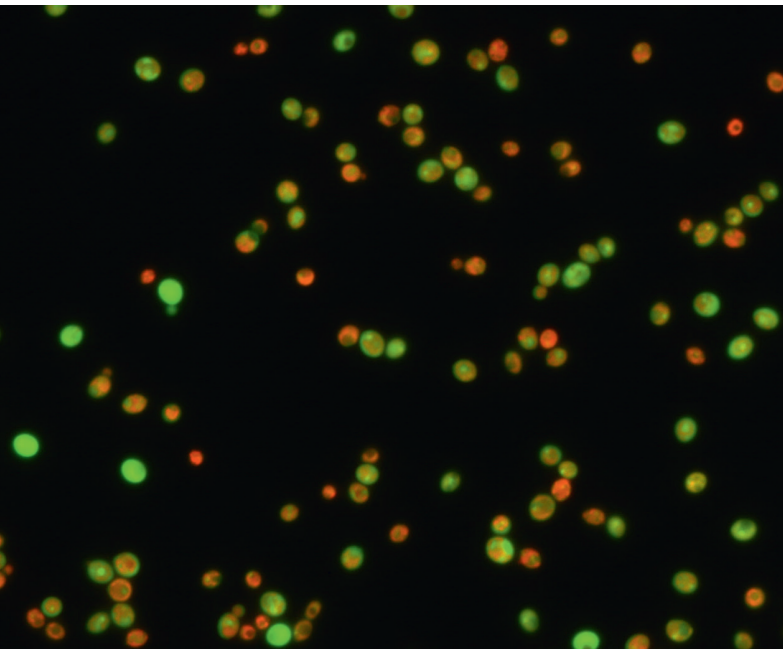


Figure 1 | Levures au microscope à épifluorescence (EPF) x 400, levures vivantes (vertes) et mortes (rouges) à l'acridine orange (AO).

Introduction

Les *Brettanomyces* sont des levures d'altération responsables de l'apparition de faux goûts dans les vins en cours de vinification ou d'élevage par la production de phénols volatils, éthyl-phénols (EP) et éthyl-gaïacol (EG).

Dès qu'un doute organoleptique apparaît dans un vin, un dénombrement des *Brettanomyces* viables et cultivables (VC) est réalisé par croissance sur milieu gélosé (fig. 2), (Gerbaux *et al.* 2000) ou dans un milieu liquide (SniffBrett®).

Cependant, cette analyse n'est pas suffisante, car chaque *Brettanomyces* peut produire des quantités très différentes de phénols volatils, voire ne pas en produire du tout (Fugelsang et Zoecklein 2003; Joseph *et al.* 2013). Ainsi le doute persiste sur la présence dans le vin d'un défaut olfactif réel. Pour vérifier si un vin est olfactivement altéré, les EP et EG présents sont alors chimiquement quantifiés (Niebel 2015).

Ces deux analyses, complémentaires, ne renseignent pourtant que partiellement sur le risque *Brettanomyces* car il existe un état de survie des micro-organismes qui les rend viables non cultivables (VBNC). Incapables de croître sur milieu de culture, les micro-organismes en VBNC peuvent conserver leurs capacités métaboliques et sortir de cet état lorsque le milieu change (Kell *et al.* 1998). La question est de savoir si les *Brettanomyces*, qui peuvent se mettre en VBNC dans les vins (Divol *et al.* 2012; Serpaggi *et al.* 2012a), conservent leur capacité de dégradation (Agnolucci *et al.* 2010; Serpaggi *et al.* 2012b) et/ou si elles la retrouvent en sortant de VBNC (Pic et Mathieu 2016). Ces VBNC peuvent être mises en évidence par marquage fluorescent à l'acridine orange (Froudière et Larue 1988) avant une analyse en cytométrie de flux (Pic et Mathieu 2016) ou par une observation au microscope à épifluorescence (EPF).

Des essais ont été conduits en vin pour évaluer le risque que ces VBNC font courir aux vins en bouteille. Dans un premier temps, différents agents chimiques et physiques (pH, alcool, SO₂, température) sont testés pour induire, puis lever l'état VBNC avec plusieurs souches de *Brettanomyces* isolées et sélectionnées dans des vins. Le risque est ensuite établi en suivant la production de phénols volatils par HPLC, la présence de VBNC par marquage fluorescent et la présence de bactéries viables et cultivables par croissance sur gélose.

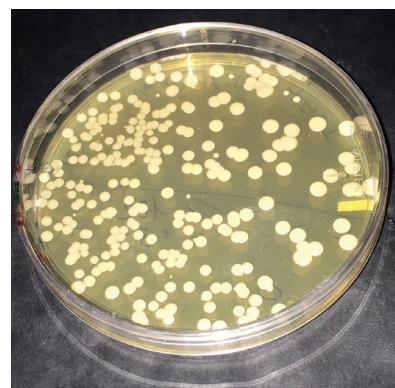


Figure 2 | Colonies de *Brettanomyces* sur YEPD Agar.

Matériel et méthodes

Souches

Quatre souches de *Brettanomyces* de la collection de Changins sont testées. Ces souches sont isolées de vins de Chasselas, Syrah, Gamaret et Merlot. Une souche de référence est ajoutée aux essais (DSMZ 70001).

Milieu de culture

Le dénombrement des *Brettanomyces* VC est réalisé sur un milieu de culture solide le YEPD Agar après dix jours de croissance en anaérobiose à 28 °C. L'identification des souches est réalisée par microscopie, les *Brettanomyces* formant sur ce milieu un pseudo mycélium très caractéristique (fig. 3).

Dans un premier temps, les *Brettanomyces* vont être acclimatées au vin, milieu doublement stressant en raison de l'alcool et du pH. Les souches sont cultivées dans un milieu riche (yeast extract patatoes dextrose: YEPD), puis repiquées en pleine croissance exponentielle dans le même milieu acidifié (pH 3,6 avec 4g/l d'acide tartrique) puis dans du YEPD pH 3,6 avec 5, puis 10 % volume d'alcool.

Les souches acclimatées sont ensuite ajoutées au vin désulfité à une concentration de 10^4 ufc/ml (unité formant colonie/ml). Lorsque la population dépasse 10^5 ufc/ml, l'essai VBNC peut débuter.

Vins

Les essais sont réalisés dans un vin blanc et un vin rouge de grande consommation (Bourgogne aligoté et Bergerac rouge issus d'un assemblage de Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Côt et Merlot, en outre souple, contenant respectivement 32 et 34 mg/l de SO_2 libre, 79 et 63 mg/l de SO_2 total, pH 3,2 et 3,5).

Les vins sont désulfités avec du H_2O_2 avant les essais. Un essai préliminaire est réalisé pour vérifier que le sulfite, puis le désulfite avec du H_2O_2 n'empêchent pas la croissance des *Brettanomyces*. Il apparaît que les souches utilisées poussent de façon identique dans du YEPD acidifié à 10%EtOH natif ou lorsque que celui est sulfite (60 mg/l SO_2 libre), puis désulfite au H_2O_2 .



Figure 3 | *Brettanomyces* au microscope x 400 contraste de phase.

Résumé Un doute apparaît parfois à la dégustation de vins sur la présence de phénols volatils, responsables d'odeurs d'écurie, médicinales et de cheval. Ces odeurs sont en particulier produites par la levure *Brettanomyces*. Les méthodes d'analyses classiques pour la mise en évidence de ces levures passent par leur dénombrement après croissance sur un milieu gélosé. Cette analyse n'est toutefois pas suffisante, car les *Brettanomyces* peuvent, en réponse à un stress, perdre leur capacité à se multiplier tout en restant viables. Cet état viable non cultivable (VBNC) est réversible. Des essais ont été conduits dans un vin rouge pour vérifier si dans cet état ou en sortant de cet état, les *Brettanomyces* conservaient leur capacité de produire des phénols volatils. Un stress de 30 mg/l de SO_2 libre permet d'induire un état VBNC. Les *Brettanomyces* perdent alors leur capacité de dégrader les vins, mais elles la retrouvent dès que le stress disparaît et qu'elles sortent de cet état VBNC.

Ces deux vins sont stériles: aucun micro-organisme ne pousse, même après désulfite.

Ces deux vins ne contiennent initialement pas de phénols volatils. Les précurseurs de ces phénols volatils (acide coumarique pour EP et acide férulique pour EG) sont ajoutés dans les vins (20 mg/l) avant l'ensemencement en *Brettanomyces*.

Les deux souches sélectionnées n'arrivant pas à s'implanter dans le vin blanc, seul le vin rouge est utilisé dans la suite des essais.

HPLC

La quantification en EP et EG est réalisée par HPLC (fig. 4) (High-Pressure Liquid Chromatography, Dionex Ultimate 3000) selon un protocole développé par Nikfardjam *et al.*

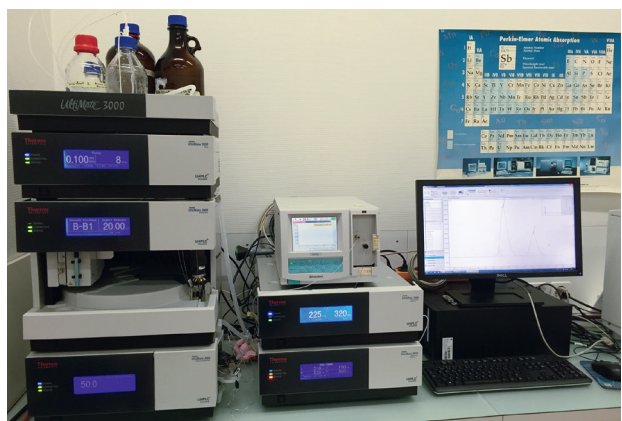


Figure 4 | HPLC.

(2009) et adapté à Changins (Silvestri 2016). Les échantillons sont filtrés sur 0,22 µm, puis séparés sur C18 (Atlantis T3 100µ) à 40°C. Les EP et EG sont détectés par un détecteur à fluorescence (FLD) avec une longueur d'onde d'excitation de 225 nm et d'émission de 320 nm (fig.5).

Epi-fluorescence (EPF)

Les *Brettanomyces* sous forme VBNC sont observées au microscope à épifluorescence (Olympus U-MWB2) après coloration avec de l'acridine orange (Fesselet 2016, Froudière et Larue 1988). Les levures mortes sont colorées en rouge et les vivantes en vert (fig. 6, 7 et 8) sous éclairage UV (Ribéreau-Gayon *et al.* 2004). La présence de cellules vertes et l'absence de développement sur milieu de culture permet de vérifier la présence de VBNC.

Analyse SO₂ libre

La concentration en SO₂ libre et total est suivie par dosage colorimétrique avec un analyseur séquentiel Y15 (Biosystems®).

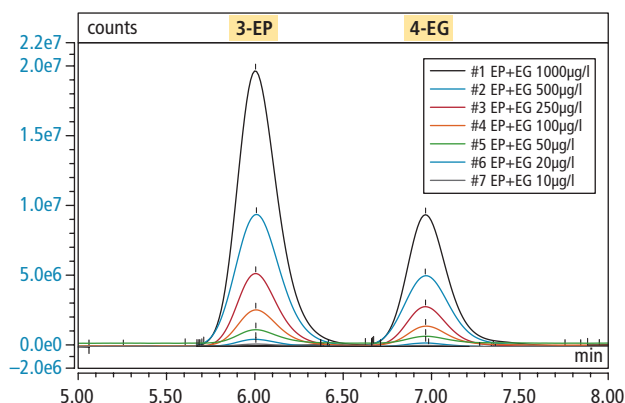


Figure 5 | Quantification HPLC des phénols volatils.

Conditions d'entrée/sortie en VBNC

La température, le pH, l'alcool et le SO₂ sont testés pour faire entrer en VBNC les *Brettanomyces* (Oliver 2010): 4°C; pH 3,1; éthanol 15 et 20 %; SO₂ libre (30 et 60 mg/l).

La variante 4°C avec et sans diminution de pH ne permet pas d'induire une entrée en VBNC. La population de VC diminue seulement de 10⁵ à 10⁴ ufc/ml après trois semaines de culture. La variante 15 % d'alcool permet une diminution drastique de la population, mais il reste encore quelques *Brettanomyces* capables de se développer. La variante 20 % d'alcool permet la disparition des *Brettanomyces* VC en cinq jours avec la présence de VBNC. Cependant, dès sept jours, des *Brettanomyces* sortent de VBNC sans action sur le vin. Cette variante peu réaliste est abandonnée. Seules les variantes d'entrée en VBNC avec 30 et 60 mg/l de SO₂ libre sont retenues.

Le SO₂ est déterminant pour l'entrée en VBNC des levures *Brettanomyces*. Le plus significatif est le SO₂ moléculaire qui dépend du SO₂ libre et du pH du milieu. Des doses comprises entre 0,2 et 1 mg/l de SO₂ moléculaire

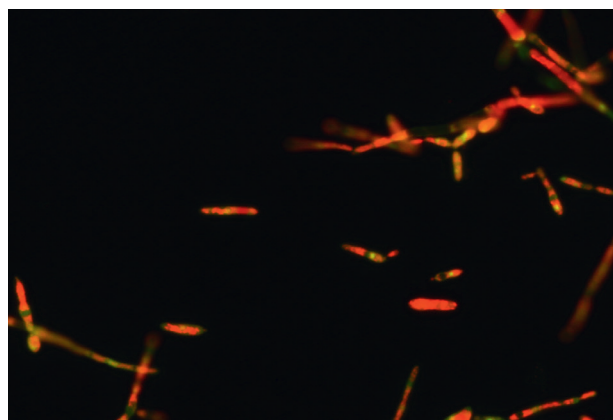


Figure 7 | Levures colorées en rouge par AO en EPF: levures mortes.

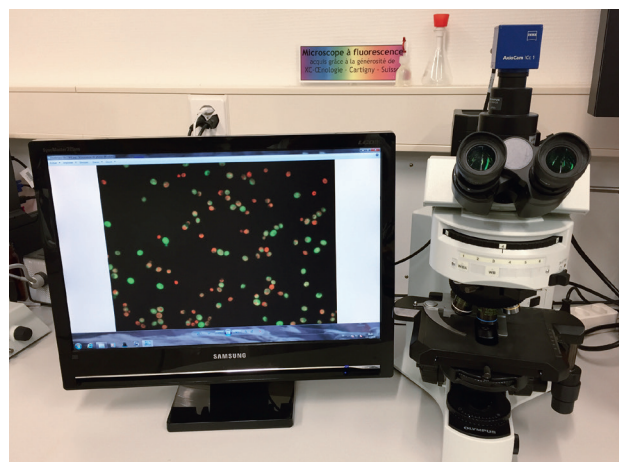


Figure 6 | Microscopie à EPF, observation d'un mélange de levures mortes et vivantes.

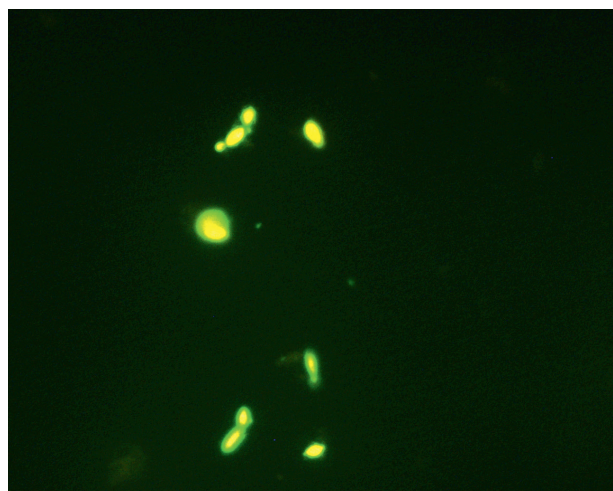


Figure 8 | Levures colorées en vert par AO en EPF: levures vivantes.

sont suffisantes pour induire l'entrée en VBNC des *Brettanomyces* (Agnolucci *et al.* 2010; Serpaggi *et al.* 2012b).

Dans le YEPD modifié (pH de 3,6 et 10 % volume d'alcool), 30 mg/l de SO₂ libre correspondent à 0,8 mg/l de SO₂ moléculaire (Serpaggi *et al.* 2012b). La sortie de VBNC peut être naturelle (diminution du SO₂ par le temps) ou provoquée par une augmentation du pH à 4. La sortie de VBNC doit être assez rapide pour améliorer la capacité de ressuscitation des souches (Lleo *et al.* 2001).

Dans la suite des essais, seul le SO₂ libre sera analysé. La sortie de VBNC est obtenue par un accroissement du pH à 4 (avec du NaOH N/5) ce qui permet la diminution du SO₂ libre à 0 mg/l.

Essais

Les deux souches sont ensemencées après acclimatation à l'alcool et au pH dans le vin modifié. Un grand volume est préparé puis réparti à t = 0 jour après acclimatation des souches en plusieurs flacons de 200 ml :

- trois témoins sans SO₂;
- quatre répétitions avec 30 mg/l de SO₂ libre;
- quatre répétitions avec 60 mg/l de SO₂ libre.

Les essais sont réalisés avec LBr13 puis LBr18.

Le schéma de l'essai est présenté en figure 9.

Résultats

Acclimatation des souches

Seulement deux des cinq souches testées arrivent à se multiplier dans du YEPD modifié (pH 3,6 + 10 % volume d'alcool). Ces souches, LBr13 et LBr18, ont été isolées à partir de Gamaret et de Merlot. Les trois autres souches arrivent à pousser dans le YEPD, mais n'arrivent pas à

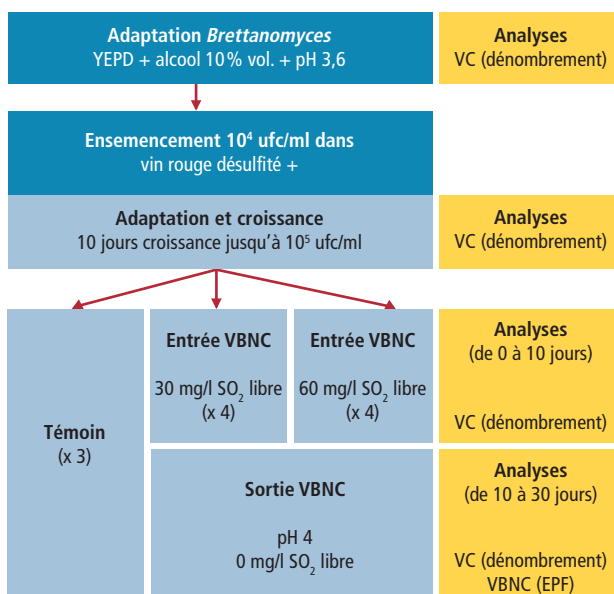


Figure 9 | Schéma de l'essai.

s'adapter au pH et à l'alcool. S'il n'est pas étonnant que la souche de référence isolée de bière n'arrive pas à s'adapter aux conditions du vin, ce résultat est plus surprenant pour les deux autres souches isolées de Syrah et de Chasselas. Le vin d'origine des souches n'explique cependant pas complètement les différences de comportement: LBr18 isolée de Merlot pousse bien dans le Bergerac Rouge (assemblage qui contient du Merlot) ainsi que LBr13 pourtant isolée à partir de Gamaret.

Les deux souches LBr13 et LBr18 sont ensuite ajoutées au vin désulfité à une concentration de 10⁴ ufc/ml. Après dix jours, la population est de 10⁵ et 1,5.10⁵ ufc/ml pour respectivement LBr13 et LBr18 et l'essai VBNC peut débiter.

Témoins

Aucun SO₂ n'est ajouté aux variantes témoin pour pouvoir suivre l'évolution des populations sans entrée en VBNC et la concentration en EP et EG dans le vin. La croissance de LBr18 est beaucoup plus rapide que celle de LBr13 (fig. 10a et b), avec une population supérieure à 10⁶ ufc/ml en 17 jours alors qu'il faut attendre 27 jours, pour avoir la même population avec LBr13. Ces différences de croissance entre souches sont souvent décrites dans la littérature (Fugelsang et Zoeklein 2003).

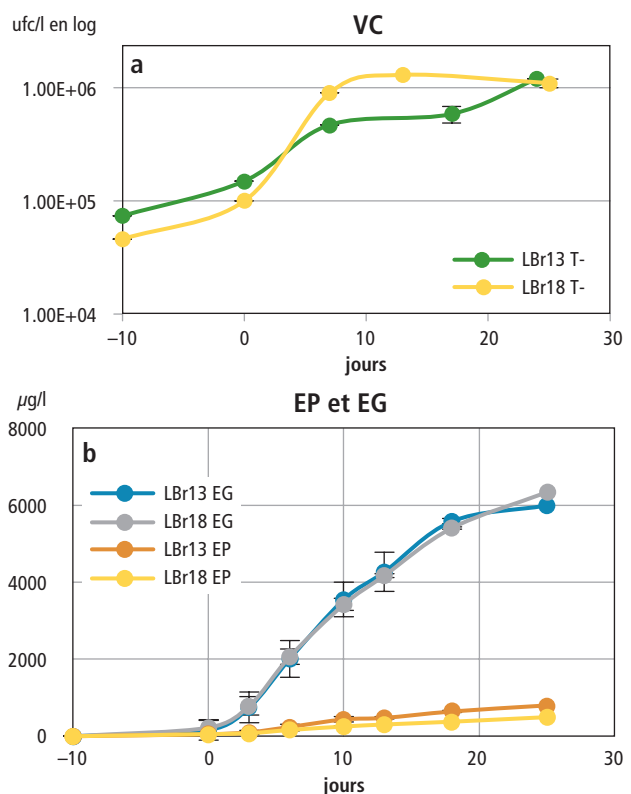


Figure 10 | a: Evolution des populations VC et b: Production de phénols volatils des deux souches.

La production de phénols volatils démarre dix jours après l'ensemencement avec les deux souches. Le début de cette production est plus lié à la durée d'adaptation des *Brettanomyces* qu'à la population atteinte car il n'existe pas de corrélation stricte entre les ufc/ml et la quantité de phénols volatils produits.

La production d'EG est beaucoup plus importante que celle d'EP, ce qui est en contradiction avec les résultats obtenus avec des vins qui contiennent des précurseurs natifs. Dans les vins rouges, le ratio entre EP/EG

est en moyenne de 8/1, ce qui correspond au ratio entre les précurseurs (Wedral *et al.* 2010). Dans cet essai, une quantité égale de précurseurs, acide férulique et coumarique, est utilisée ce qui peut expliquer en partie ces résultats.

LBr13

L'ajout de SO₂ libre à 30 et 60 mg/l entraîne une disparition totale de la population de *Brettanomyces* capable de croître sur milieu de culture (fig. 11 a, b, c, d, et f).

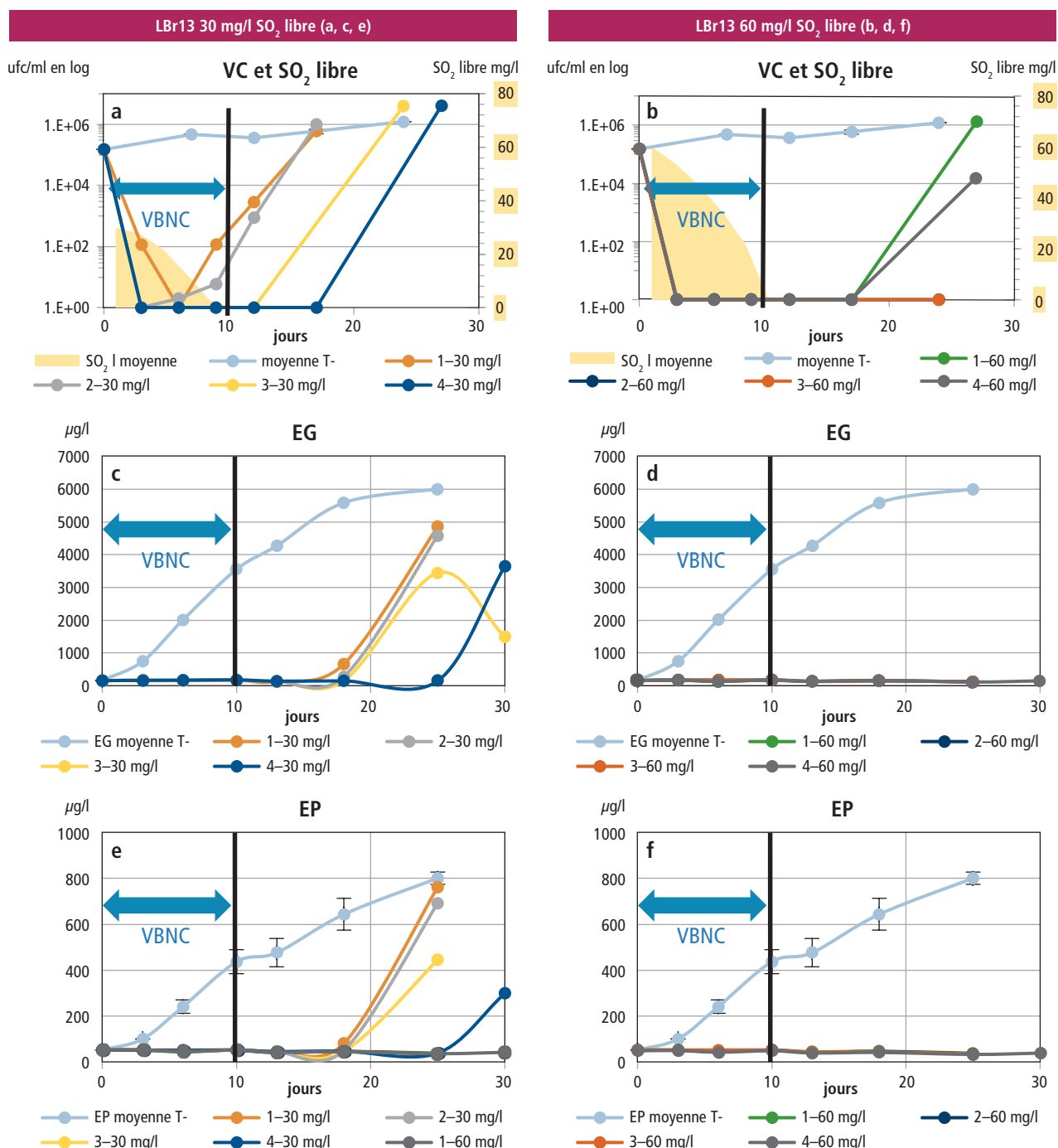


Figure 11 | LBr13 Suivi de la population en VC (ufc/ml = nombre de cultivables/ml), de la quantité de SO₂ libre (mg/l) et de la production en EP (HPLC µg/l)

Durant les dix jours de VBNC, un marquage fluorescent permet de vérifier la présence de levures colorées en vert, donc en VBNC (résultats non présentés), malgré une absence de colonies sur milieu de culture. La sortie de VBNC apparaît de façon naturelle dans deux répétitions de la variante avec 30 mg/l de SO₂ libre dès que la quantité de SO₂ libre diminue en dessous de 20 mg/l, seuil limite de développement pour les *Brettanomyces* (Zuehlke et Edwards 2013). Les deux autres répétitions mettent plus de temps pour retrouver leur cultivabilité

(13 et 17 jours), alors que les valeurs de SO₂ libre sont identiques dans les quatre répétitions.

La capacité de cette souche à fabriquer des EP et EG est retrouvée au mieux dix jours après la sortie de VBNC. Il ne semble pas possible de corréler directement la population VC de *Brettanomyces* et la production d'EP/EG (Fugelsang et Zoecklein 2003), même si des populations >10⁴ ufc/ml semblent nécessaires.

Dans les essais avec 60 mg/l de SO₂ libre, il faut attendre l'ajustement du pH à 4 pour voir une sortie de

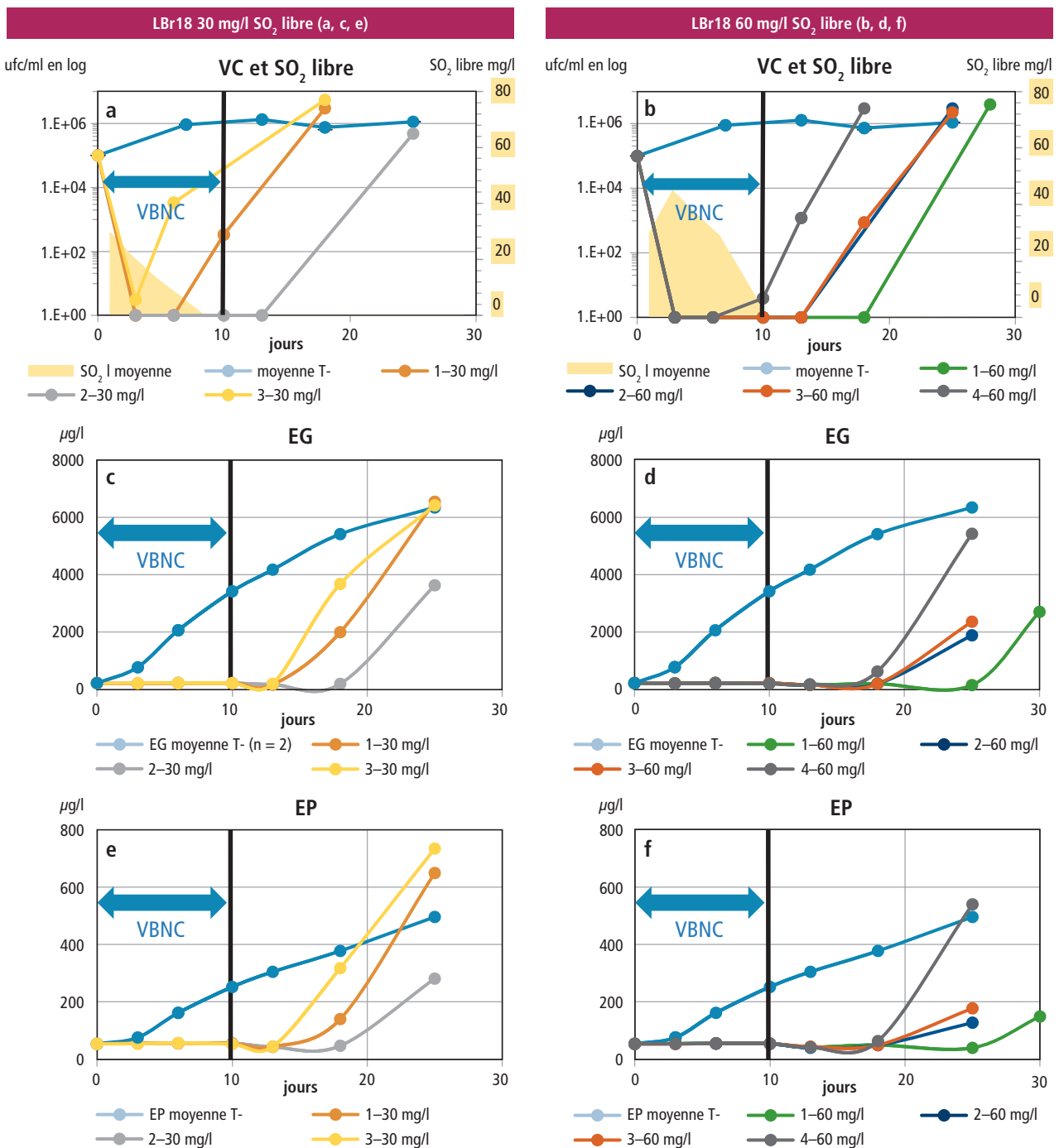


Figure 12 | LBr18 de la population VC (ufc/ml = nombre de cultivables/ml), de la quantité de SO₂ libre (mg/l) et de la production en EP (HPLC µg/l)

VBNC plus d'une semaine après que les conditions du milieu soient redevenues favorables. La production de phénols volatils n'est pas démontrée dans cette variante, probablement car les mesures en EP/EG ont été arrêtées trop rapidement, soit moins de dix jours après la sortie de VBNC. Les profils des courbes de production d'EP et EG sont identiques.

LBr18

Il ne reste que trois répétitions avec 30 mg/l de SO₂ libre car une répétition est contaminée. La tendance reste la même entre cette souche et LBr 13 avec une sortie plus rapide de VBNC avec 60 mg/l de SO₂ libre et une fabrication de EG/EP dans toutes les variantes dix jours après la sortie de VBNC (fig. 12 a, b, c, d, e, f).

Cette souche est moins sensible au SO₂ libre et retrouve une capacité à croître sur milieu de culture plus facilement que LBr13.

Le décalage entre la sortie de VBNC et la capacité à fabriquer des EP/EG reste pour cette souche aussi d'une dizaine de jours.

Comparaison LBr13 et LBr18

Alors que les teneurs en SO₂ et les pH sont identiques dans les deux essais, le comportement des souches est différent: la croissance de LBr18 est plus rapide et sa tolérance au SO₂ libre plus élevée. La souche LBr13 est plus sensible et sort difficilement de VBNC dans les essais avec 60 mg/l de SO₂ libre, alors que la souche LBr18 peine à rentrer en VBNC dans la variante avec 30 mg/l de SO₂ libre, avec par exemple deux des trois répétitions qui sortent de VBNC en quelques jours et une répétition qui sort de VBNC seule dans l'essai avec 60 mg/l de SO₂ libre.

Remerciements

Ces résultats ont été obtenus grâce au travail de M^{mes} Julie Niebel (HES 13-15) et Valentine Fesselet (HES 14-16) au cours de leur thèse de Bachelor.

Bibliographie

- 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** (1-2), 76–80.
- 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.
- Fesselet V., 2016. *Brettanomyces*, VBNC (Viable Non Cultivable) et risques de déviations organoleptiques. *Thèse de Bachelor de Changins*.

Conclusions

- Une teneur supérieure à 20 mg/l de SO₂ libre dans un vin rouge permet d'induire un état VBNC des *Brettanomyces* avec une perte de cultivabilité.
- Dans les conditions de cet essai, les *Brettanomyces* maintenues en VBNC par des teneurs en SO₂ libre supérieures à 20 mg/l ont perdu leur capacité de fabriquer des phénols volatils.
- Les souches restent vivantes, car vertes en marquage fluorescent. Dès que la teneur en SO₂ libre diminue en dessous de la valeur clef de 20 mg/l, elles retrouvent leur cultivabilité.
- Dix jours après la sortie de VBNC, qui se manifeste par une croissance sur Agar, les deux souches testées retrouvent leur capacité de fabriquer des phénols volatils.
- Un autre renseignement intéressant est la différence de comportement d'une souche à l'autre. Plusieurs souches sorties de banque ont perdu leur capacité à se multiplier dans un milieu acide avec de l'alcool. Les deux souches utilisées dans l'essai ont:
 - des courbes de croissance différentes;
 - une sensibilité au SO₂ différente.
- Cet essai a permis de démontrer dans un vin rouge que le seul dénombrement des micro-organismes sur un milieu de culture ne permet pas de mesurer l'étendue d'un risque *Brettanomyces* car toutes les *Brettanomyces* n'ont pas un comportement identique et les *Brettanomyces* peuvent en sortant de VBNC redevenir problématiques.
- D'autres essais sur un plus grand laps de temps devraient être menés pour affiner la notion de seuil de SO₂ nécessaire pour garantir un maintien en VBNC des *Brettanomyces*. Ces essais devraient être basés sur le SO₂ moléculaire avec un plus grand nombre de souches. ■

- Froudière I. & Larue F., 1988. Détermination par épifluorescence des levures vivantes dans le moût de raisin. *Connaissance de la vigne et du vin* **22** (3), 237–240.
- 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.
- Gerbaux V., Jeudy S. & Monamy C., 2000. Etude des phénols volatils dans les vins de Pinot noir en Bourgogne. *Bulletin de l'OIV* **73** (835-836), 581–599.
- Joseph C. M. L., Gorton L. W., Ebeler S. E. & Bisson L. F., 2013. Production of Volatile Compounds by Wine Strains of *Brettanomyces bruxellensis* Grown in the Presence of Different Precursor Substrates. *Am J Enol Vitic.* **64** (2), 231–240.
- Kell D. B., Kaprelyants A. S., Weichart D. H., Harwood C. R. & Barer M. R., 1998. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **73** (2), 169–187.

Summary

Assessment of non-cultivable *Brettanomyces* in red wine

At wine tastings doubts arise sometimes about the presence of volatile phenols, which are often the cause for barnyard, cloves, animal or stable odors. These odors are produced by *Brettanomyces* yeasts. Classic analysis methods include the counting of yeast cells after growth on agar medium. This analysis is not sufficient because *Brettanomyces* yeast may lose its ability to multiply all cells in response to stress but still remain viable. This viable but not cultivable (VNC) state is reversible. Tests were carried out in a red wine to find out if *Brettanomyces* yeasts, in the above mentioned state or exiting of it, retained their ability to produce volatile phenols. A stress factor of 30 mg/l free SO₂ induced a VNC state. *Brettanomyces* yeasts lose the ability to degrade the wines but retrieve it as soon as the stress factor disappears and the yeast cells recover from their VNC state.

Key words: *Brettanomyces*, Ethyl-phenol; Ethyl-gaiacol; VBNC; HPLC, EPF, Acridine orange, VBNC, VC, SO₂.

Zusammenfassung

Abschätzung des Risikos von nicht kultivierbaren *Brettanomyces* Hefen in Rotwein

Bei der Verkostung von Weinen entstehen manchmal Zweifel, ob flüchtige Phenole vorhanden sind, welche für Gerüche nach Reitstall, Gewürznelken, oder Stall oft verantwortlich sind. Diese Gerüche werden von *Brettanomyces* Hefen produziert. Die klassischen Analyse-Methoden beruhen auf der Auszählung der Hefen nach deren Vermehrung auf Agar. Diese Analysen reichen nicht aus, weil *Brettanomyces* Hefen ihre Fähigkeit, alle lebensfähigen Zellen zu vermehren, aufgrund einer Stressreaktion verlieren kann, obwohl sie lebensfähig bleiben. Dieser lebensfähige, nicht kultivierbare (VNC) Zustand ist umkehrbar. Versuche wurden in einem Rotwein durchgeführt, um zu prüfen, ob *Brettanomyces* Hefen im erwähnten oder aus ihm heraustretenden Zustand, ihre Fähigkeit behalten, flüchtige Phenole zu produzieren. Ein Stress von 30 mg/l freier SO₂ induzierte den VNC-Zustand. *Brettanomyces* Hefen verlieren dabei ihre Fähigkeit, Weine zu degradieren, gewinnen diese Fähigkeit aber zurück, sobald der Stress verschwindet und sie aus dem VNC-Zustand heraustreten.

Riassunto

Valutazione del rischio dei *Brettanomyces* non coltivabili in un vino rosso

Un dubbio appare talvolta alla degustazione dei vini sulla presenza di fenoli volatili responsabili di odori di scuderia, chiodi di garofano, cavallo. Questi odori sono prodotti del lievito *Brettanomyces*. I metodi di analisi classici passano dal conteggio dei lieviti dopo la crescita nell'agar. Questo stato viabile non coltivabile (VNC) è reversibile. Dei test sono stati condotti nel vino rosso per verificare se in questo stato o uscendo da questo stato i *Brettanomyces* conservavano le loro capacità a produrre dei fenoli volatili. Uno stress di 30 mg/l di SO₂ permette di indurre uno stato VCN. I *Brettanomyces* perdono allora la loro capacità di degradare i vini ma la ritrovano dal momento che lo stress sparisce e che escono da questo stato VCN.

- Lleo M. M., Bonato B., Tafi M. C., Signoretto C., Boaretti M. & Canepari P., 2001. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *J. Appl. Microbiol.* **91** (6), 1095–1102.
- Niebel J., 2015. Les phénols volatils dans les vins rouges: aspects analytique et microbiologique. *Thèse de Bachelor de Changins*.
- Nikfardjam M. P., May B. & Tschiersch C., 2009. 4-Ethylphenol and 4-ethylguaicol contents in bottled wines from the German 'Wurttemberg' region. *European Food Research and Technology* **230** (2), 333–341.
- Oliver J.D., 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **34** (4), 415.
- Pic L. & Mathieu J., 2016. *Brettanomyces*: faut-il craindre les VBNC? *Revue Internet de viticulture et œnologie* **10** (1).
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B. & Lonvaud-Funel A., 2004. *Traité d'œnologie Tome 1; Microbiologie du Vin Vinification*, Paris.
- Serpaggi V., Remize F., Recorbet G., Gaudot-Dumas E., Sequeira-Le Grand A. & Alexandre H., 2012a. Characterization of the «viable but nonculturable» (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiology* **30** (2), 438–447.
- Silvestri A.-C., 2016. Détection des phénols volatils responsables des odeurs brettées des vins. *Objectif* (84), 13–17.
- Wedral D., Shewfelt R. & Frank J., 2010. The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT - Food Science and Technology* **43** (10), 1474–1479.
- 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.