

BRETTANOMYCES: AS CÉLULAS VNC SÃO PERIGOSAS?

Lucile PIC e Jacques MATHIEU

GIE ICV VVS

INTRODUÇÃO

Desde o início dos anos 90 que as *Brettanomyces* são consideradas contaminantes das fermentações alcoólicas e, em particular, da indústria enológica (Larue 1991).

O desenvolvimento destas leveduras nos vinhos conduz ao aparecimento de características olfativas geralmente descritas como animais, fenoladas, farmacêuticas, “plástico queimado” e “suor de cavalo”. Estes odores que, frequentemente, não são aceites pelos consumidores, levam a uma degradação e a uma uniformização da qualidade dos vinhos.

Os principais compostos (4-etilfenol = 4EF e 4-etilguaiacol = 4EG) que dão lugar a estas alterações olfativas e gustativas e as vias metabólicas que conduzem ao seu aparecimento nos vinhos contaminados por *Brettanomyces*, começaram a ser descritos a partir de 1992 por Chatonnet. Estes fenóis voláteis derivam da transformação por via enzimática dos ácidos cinâmicos, que se encontram presentes, de forma natural, na uva e no vinho (ácido p-cumárico, ferrúlico e cafeíco), em vinil-fenóis e, de seguida, em fenóis de etilo. Geralmente, considera-se o limiar olfativo destas moléculas em 400 µg/l, no entanto, estudos publicados por Bramlley *et al.*, 2007, mostram que este limiar se encontra entre 138 µg/l e 1528 µg/l, variando em função da matriz e da relação entre as quantidades das moléculas envolvidas.

A consciencialização por parte dos profissionais perante os danos qualitativos e comerciais gerados pelo desenvolvimento destes microrganismos nos vinhos tintos, conduziu ao desenvolvimento de diversas técnicas de deteção das *Brettanomyces* nos vinhos.

De seguida são apresentados os três métodos analíticos específicos mais utilizados na atualidade:

1. Cultura em meio nutritivo sólido e seletivo;
2. Técnica de PCR quantitativa (Q-PCR), baseada nas técnicas de biologia molecular, permitindo a amplificação específica do DNA das *Brettanomyces* (Phister *et al.*, 2003; Delaherche *et al.*, 2004; Agnolucci *et al.*, 2007; Tessonnière *et al.*, 2009; Tofalo *et al.*, 2012; Portugal *et al.* Ruiz-Larrea, 2013);
3. Citometria de fluxo, associada tanto à técnica de hibridação in situ (FISH) com sondas para o RNA ribossómico 26S de *Brettanomyces* (Serpaggi *et al.*, 2010), como à marcação anticorpo-antigénio (Chaillet *et al.*, 2014).

As técnicas de citometria e Q-PCR apresentam a vantagem de serem relativamente rápidas (entre 4 a 72 horas), comparativamente à cultura em meio seletivo, com uma duração de 7 dias.

Outra diferença importante relativamente a esta última técnica, é o facto de esta permitir quantificar, não somente, as células viáveis cultiváveis, mas também, as células viáveis não cultiváveis (VNC).

Efetivamente, demonstrou-se que, em determinadas condições e especialmente depois de tratamentos de estabilização microbiológica, como a sulfitação, as *Brettanomyces* podem passar a um estado “viável não cultivável”, ou seja, perdem a capacidade de se multiplicar em meio nutritivo, mantendo-se metabolicamente ativas (Agnolucci *et al.*, 2010, du Toit *et al.*, 2005, Serpaggi *et al.*, 2012).

Os autores evidenciaram também que, em igualdade de condições, as leveduras VNC e as *Brettanomyces* que saem do estado VNC produzem uma quantidade de fenóis voláteis significativamente menor que a modalidade testemunha (*Brettanomyces* viáveis cultiváveis). Estes

trabalhos foram realizados com um meio modelo (GAV 10%, pH 3.5) e ainda não foram realizados em condições reais (meio -vinho).

Com a finalidade de ajudar os enólogos na escolha do método de análise melhor adaptado para a prevenção da formação de fenóis voláteis e notas “animais” nos vinhos, comprometemo-nos, através deste trabalho (realizado no âmbito do grupo nacional *Brettanomyces* financiado pelo France Agrimer) a avaliar, na matriz vinho, a capacidade das *Brettanomyces* VNC produzirem fenóis voláteis.

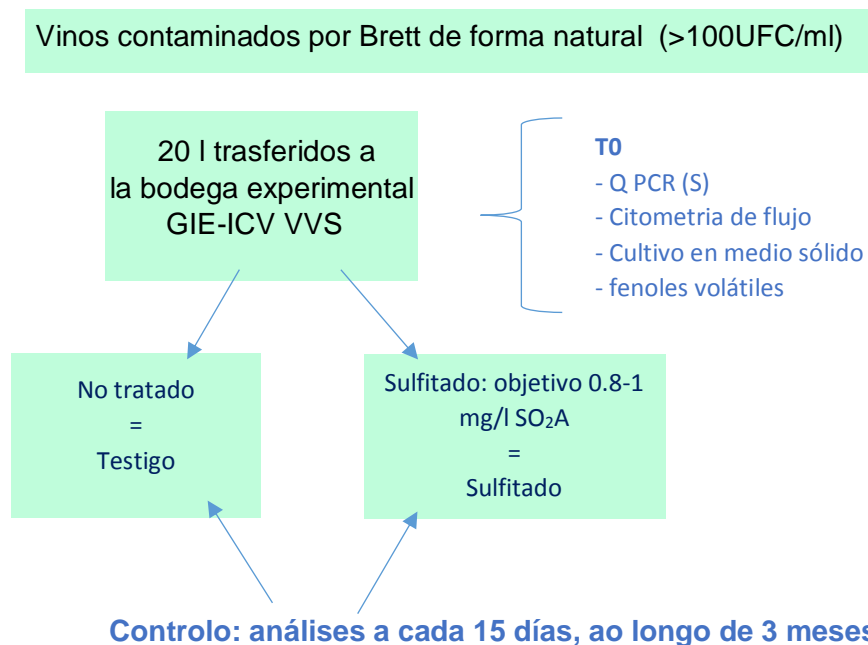
MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados três vinhos, das colheitas de 2013, 2014 e 2015 (Tabela 1), nos quais se tinha detetado a presença de forma natural de *Brettanomyces* através da cultura em meio nutritivo sólido. De cada vinho foram analisados 20 litros.

Tabela 1: características analíticas do vinho no momento da receção na adega experimental

	Depósito	SO ₂ livre (mg/L)	SO ₂ total (mg/L)	pH	Açúcares (g/L)	SO ₂ ativo calculado (mg/L)	TAV (%)
2015	B005-15	<8	26	3.65	<2	0.13	13.76
	B001-14	16	40	3.78	<2	0.25	12.41
2014	B002-14	<8	35	3.75	4.6	0.16	13.63
	B003-14	<8	26	3.57	<2	0.08	13.72
2013	Ard	<8	<15	3.61	<2	0.11	11.62
	BdV	23	42	3.6	<2	0.52	12.41

Os 20 litros foram divididos em dois lotes de 10 litros: o primeiro lote representa a modalidade testemunha, ao segundo lote adicionou-se dióxido de enxofre (SO₂ livre, compreendido entre 0,8 e 1 mg/L = modalidade “sulfitado”). Ambas as amostras foram mantidas a 14°C. O objetivo da adição de dióxido de enxofre foi induzir um estado VNC nas leveduras (Serpaggi et al, 2012).



- Q PCR (S)
- Citometria de fluxo
- Cultura em meio sólido
- Quantificação de fenóis voláteis
- SO₂ ativo

Figura 1: Ilustração experimental e monitorização analítica

Foram selecionados três métodos de análises para o controlo das populações de *Brettanomyces*:

1. Cultura em meio sólido (YEPD = 20g/L de glucose, 20 g/L de peptona, 20 g/L de agar, 10 g/L de extrato de levedura), transformado em meio seletivo pela adição de 50mg/L de cicloheximida, realizado nos nossos laboratórios de microbiologia.
2. Q-PCR realizadas no laboratório Microflora de Bordéus.
3. A citometria de fluxo acoplada a uma marcação do tipo FISH (Serpaggi 2010), realizada no IUVV de Dijon (não foi realizada nos vinhos de 2013).

A dosagem dos fenóis voláteis foi realizada por extração mediante HS-SPME seguida da quantificação por GC-MS (limite de deteção 5µg/L) no laboratório Pure Environnement.

À receção da adega, foram realizadas análises microbiológicas segundo os três métodos e foi efetuada a quantificação dos fenóis voláteis (T0).

Os controlos microbiológicos e a quantificação dos fenóis voláteis foram realizados a cada 8 dias ao longo do primeiro mês de conservação e depois, a cada 15 dias ao longo dos dois meses seguintes. A par destas análises foi realizado o acompanhamento enológico clássico que, entre outras ações, permitiu efetuar os reajustamentos necessários para manter o SO₂ livre entre 0.8 e 1mg/l.

RESULTADOS

1. Nem todos os métodos quantificam os mesmos valores

Nos 5 vinhos “testemunha” que não apresentavam SO2 livre e ativo, os níveis de contaminação estimados oscilam entre 10³ e 10⁶ UFC/mL em função da matriz. Foi possível observar uma correspondência satisfatória entre os três métodos de análise (Figura 2). Efetivamente, apesar de se constatar, esporadicamente, um desvio de 1 log entre os diferentes métodos, as recomendações associadas aos resultados da contagem seriam as mesmas, independentemente do método escolhido: para 4 dos 5 vinhos o nível de contaminação estaria associado a um elevado risco de alteração do vinho ao longo de toda a fase de monitorização. Para o vinho BDV-2013, o nível de risco é considerado baixo no tempo T0 mas atingiria, um limiar crítico após 20 dias (devido à concentração baixa de SO2 ativo).

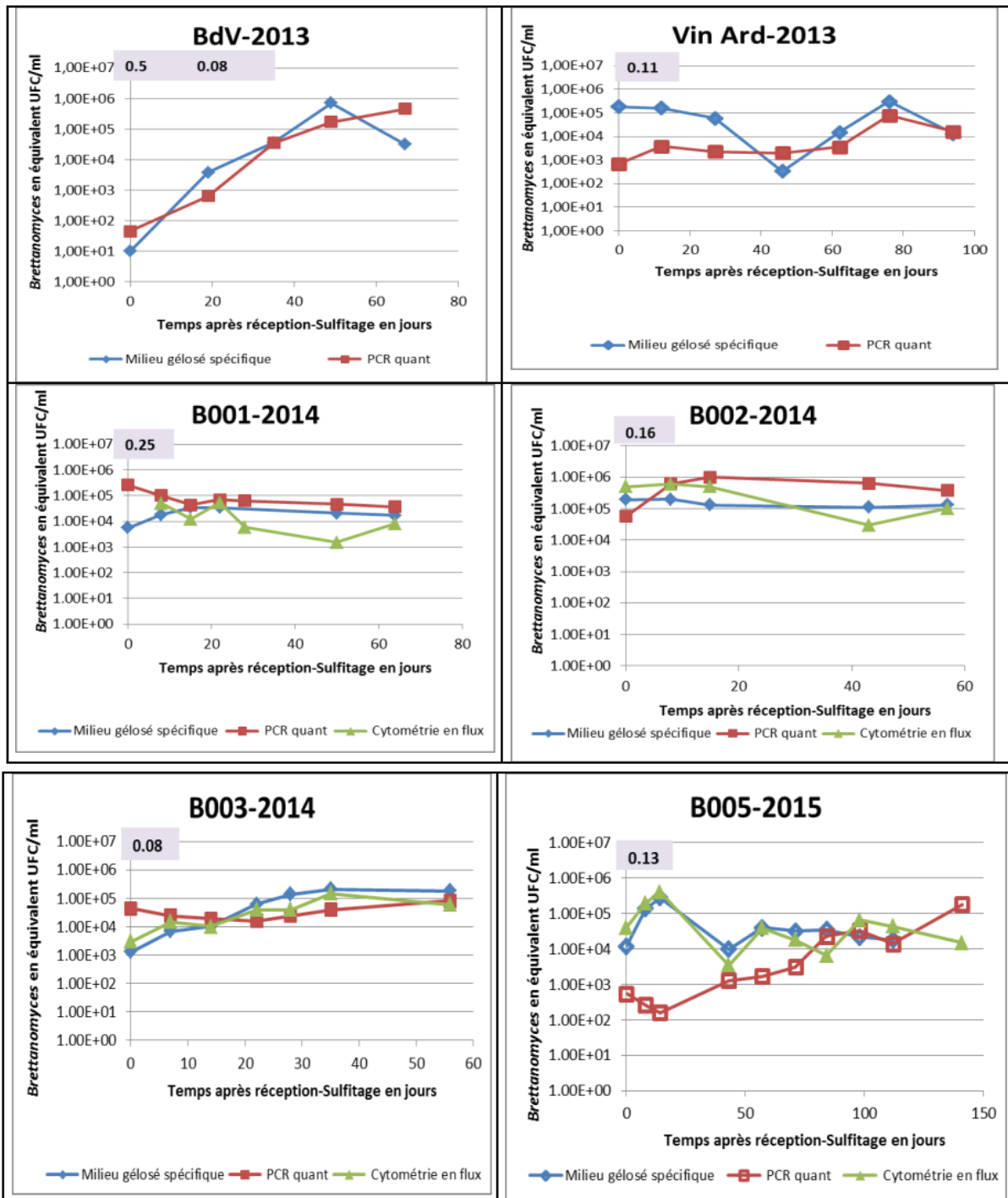


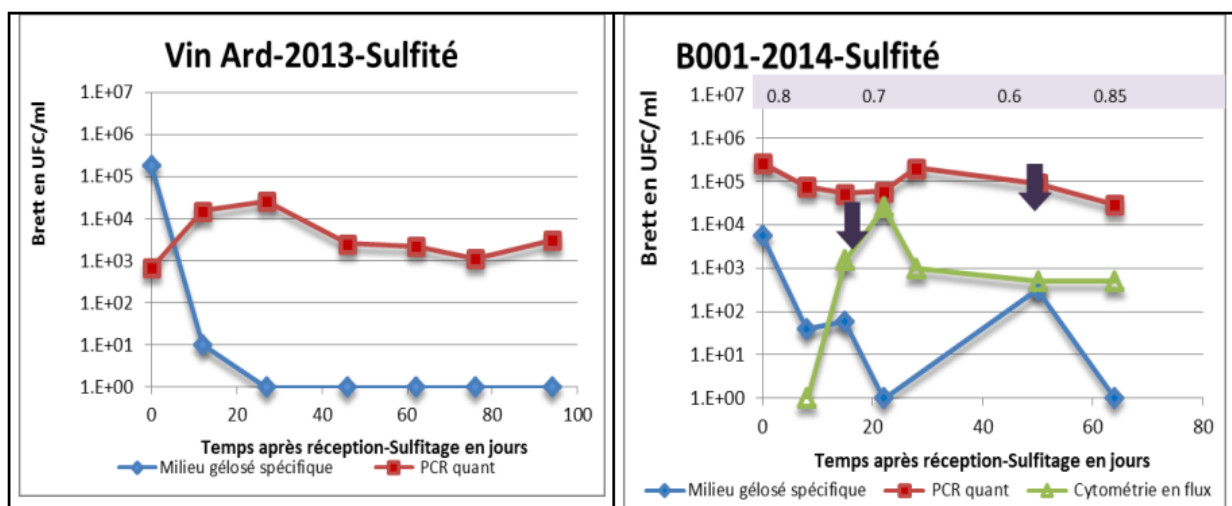
Figura 2: Comparação dos três métodos de quantificação de *Brettanomyces*, considerando o acompanhamento no tempo, dos vinhos não sulfitados e mantidos a 14 ° C.

No vinho BdV2013, a adição de SO2 não foi suficiente para manter um nível de SO2 livre superior a 0.6 mg/l. Como tal, essa modalidade não foi considerada na fase de tratamento de dados.

Na modalidade "sulfitados", em que os níveis de SO2 ativos permaneceram acima de 0,5 mg / l, ao longo de todo o tempo em que as amostras foram acompanhadas, foram observadas diferenças significativas entre os resultados analíticos dos diferentes métodos de contagem (de 3 a 5 log). Estas diferenças seguem sempre a mesma lógica: quando a população estimada foi inferior a 10 UFC / ml em placa de petri, os métodos de Q-PCR e citometria evidenciavam uma população maior ou igual a 1.000 UFC / ml.

Este resultado confirma que na matriz vinho, como demonstrado no meio sintético de Serpaggi (2012), uma sulfitação importante conduz a um forte nível de SO2 ativo, induzindo o estado VNC nas *Brettanomyces*.

Estes dados ilustram ainda a particularidade de cada um dos métodos de análise estudados: os métodos Q-PCR e citometria de fluxo detetam as *Brettanomyces* viáveis cultiváveis e as VNC, enquanto que a cultura em meio sólido específico não deteta as VNC.



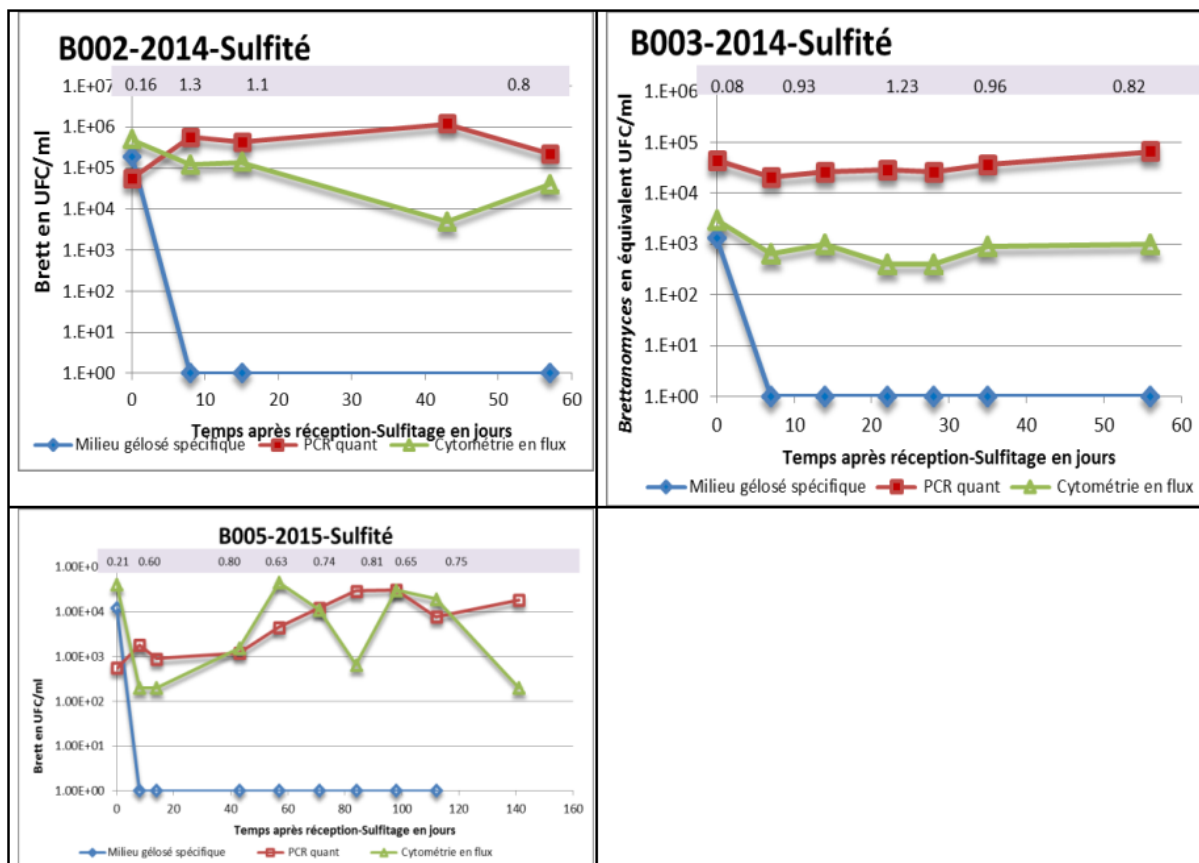


Figura 3: Comparação dos três métodos de quantificação de Brettanomyces, considerando a monitorização ao longo do tempo nos vinhos com adição de enxofre e conservados a 14 ° C. SO2 ativo em mg / l

Nestas matrizes sulfitadas, o risco de alteração a curto prazo estimado variar em função do método de análise microbiológica escolhido: geralmente este risco é nulo ou relativamente baixo, com monitorização por cultura em meio de agar sólido, enquanto que é um risco muito elevado com os métodos Q-PCR ou citometria de fluxo. Note-se ainda que os níveis de contaminação estimados por Q-PCR foram maiores do que os estimados por citometria.

2. As VNC não produzem fenóis voláteis em quantidade suficiente para prejudicar a qualidade do vinho

Acompanhando a evolução de fenóis voláteis realizada em cada lote ao longo deste estudo, nota-se um aumento do conteúdo destas moléculas de 300 a 1000 mg / l, nas modalidades “testemunha”, enquanto que nos lotes sulfitados as concentrações não foram modificadas, considerando o mesmo período de tempo (Figura 4).

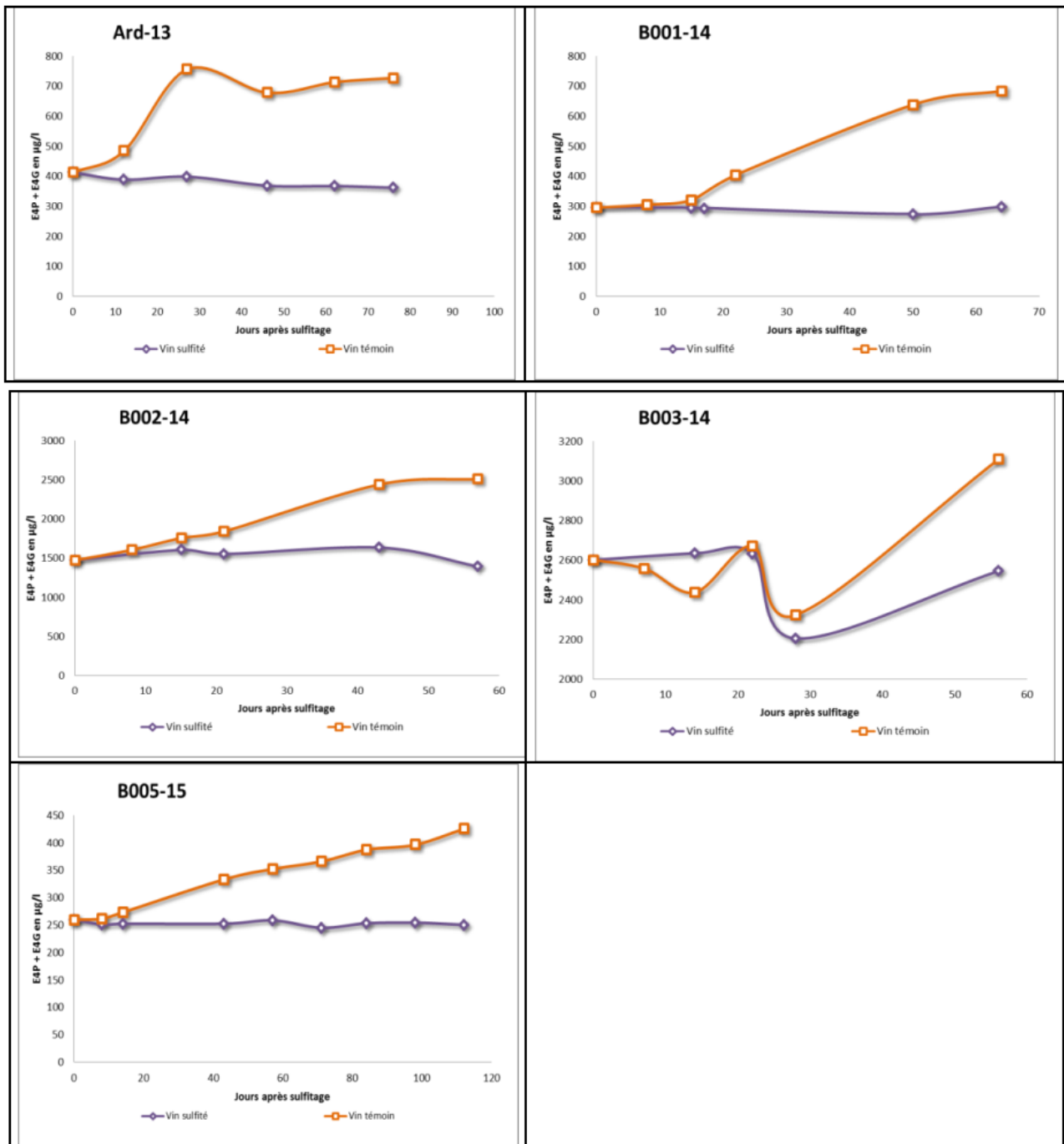


Figura 4: Evolução da concentração de fenóis voláteis nos vinhos na modalidade “testemunha” e nos vinhos sulfitados conservados a 14 ° C.

A monitorização microbiológica evidenciou que as *Brettanomyces* presentes na modalidade “sulfitados” estão em estado VNC, enquanto que nos vinhos de controlo, as mesmas, estão no estado viáveis e cultiváveis (Figura 2 e Figura 3). Uma vez que apenas na modalidade “testemunha” ocorreu uma evolução significativa de fenóis voláteis, estes resultados sugerem que, no período do estudo e na matriz vinho, as *Brettanomyces* em estado VNC produzem fenóis voláteis em quantidades insignificantes.

CONCLUSÕES

Os testes realizados nos vinhos das três colheitas confirmaram que os diferentes métodos para detecção de *Brettanomyces* apresentam resultados diferentes. Nas matrizes não sulfitadas, os resultados obtidos com cada um dos métodos (Q-PCR, citometria de fluxo acoplado a um marcador por FISH e o meio de cultura sólido com ágar específico) são comparáveis. Por sua vez, nas matrizes sulfitadas, a cultura quantifica somente as *Brettanomyces* viáveis cultiváveis, enquanto que os outros dois métodos também detetam as *Brettanomyces* VNC. Na verdade, o risco de alteração estimado por cada um dos métodos num vinho sulfitado muda: é sistematicamente mais elevado com os métodos de Q-PCR e citometria.

No entanto, demonstramos que nas matrizes sulfitadas a evolução do teor de fenóis voláteis é quase insignificante ao longo dos primeiros 2-3 meses. Apenas as *Brettanomyces* em estado viável cultivável foram responsáveis durante o mesmo período de tempo por uma evolução significativa do conteúdo de fenóis voláteis.

Esses resultados destacam a importância da escolha do método de controlo microbiológico de acordo com o objetivo pretendido. Numa matriz contendo SO₂ ativo suficiente, os métodos Q-PCR e citometria de fluxo poderiam sobrestimar o risco real de alteração dos vinhos de curto e médio prazo. Na verdade, poderiam causar custos adicionais ao aplicar tratamentos desnecessários. A cultura em meio sólido seletivo, que deteta apenas as células viáveis cultiváveis, fornece informações mais precisas sobre a formação de odores fenolados nos vinhos a curto e médio prazo.

No entanto, pode-se concluir que as leveduras VNC podem representar um risco real, visto que poderiam voltar ao estado viáveis cultiváveis. Na verdade, Serpaggi 2012, observou este mecanismo num modelo médio no caso de diminuição de SO₂ ativo. Até à data, não são conhecidos outros fenómenos que provoquem a saída do estado VNC, fazendo com que não se possa excluir a existência de outros mecanismos capazes de alterar esse estado. No entanto, resta sempre a questão da capacidade das *Brettanomyces* para produzirem fenóis voláteis ao sair do estado VNC.

Para os vinhos, nos quais é possível manter o nível de SO₂ ativo, que induziu a formação das *Brettanomyces* VNC, estas últimas não representam um risco real. Esse risco é real somente para vinhos em que existe um risco real de uma diminuição acentuada no nível de SO₂ ativo.

Referências bibliográficas

Agnolucci M, Scarano S, Nuti M (2007) Detection of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* in pressed Sangiovese grapes by real-time PCR. *Journal of Food Science* 2, 153–164.

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*. *Int J Food Microbiol* 143, 76-80.

Bramley B., Cutin C., Cowey G., Holdstock M., Coulter A., Kennedy E., Travis B., Mueller S., Lockshin L., Goddenn P., Francis L., 2007. Wine Style alters the sensory impact of "Brett" flavour compounds in red wines. Poster presented at AWITC 2007, Adelaide

Chaillet L., Martin G., Genty V. 2014. *Bretta* test blue Mise au point d'une méthode de detection des *brettanomyces* par immunocytométrie. Congrès AFC-SFI 2014. Poster

Chatonnet P., 1992, The origin of ethylphenols in wines, *J. Sci. Food Agric.*, 60: 165-178.

Delaherche A, Claisse O, Lonvaud-Funel A (2004) Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology* 97, 910–915.

Du Toit W., Pretorius I, Lonvaud-Funel A. 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and cultivability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *J Appl Microbiol* 98, 862-871.

Larue F et al, 1991. Incidence du développement de *Dekkera/Brettanomyces* dans les moûts et les vins. *J. Int. Sciences Vigne Vin*, 25, 149- 155

Phister T, Mills DA (2003) Real-time PCR assay for the detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7430–7434.

Portugal C, Ruiz-Larrea F (2013) Comparaison of specific Real-time PCR and conventional culture for detection and enumeration of *Brettanomyces* in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 64,1 39-145.

Serpaggi V, Remize F, Sequeira-Le Grand A, Alexandre H (2010) Specific Identification and Quantification of the spoilage microorganism *Brettanomyces* in wine by Flow Cytometry: a useful tool for winemakers. *Cytometry A* 6: 496-499.

Serpaggi V, Remize F, Recorbet G, Gaudot-Dumas E (2012) Characterization of the “viable but non culturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiol.* 30, 438-447.

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

Tofalo R, Schirone M, Corsetti A, Suzzi G (2012) Detection of *Brettanomyces* spp. In red wines using real-time PCR *J Food Sciences* 77, 545- 549.