

NOVOS CONHECIMENTOS CIENTÍFICOS E PRÁTICOS PARA PREVENÇÃO DOS AROMAS FENÓLICOS PROVOCADOS POR *BRETTANOMYCES*

Christophe Gerland, Intelli'oen Sarl, christophe.gerland@intellioeno.com

Os aromas fenólicos ligados à *Brettanomyces* são um dos principais defeitos dos vinhos tintos, nomeadamente nas regiões vitícolas tradicionais e com colheitas de excelente qualidade. Estes defeitos afectam também significativamente os países com clima quente como a Austrália, o Chile,

Estes desvios estão a aumentar: durante o *International Wine Challenge*, em Londres, em mais de 10 000 vinhos provados nos anos: 2006, 2007 e 2008, a percentagem de vinhos com aromas fenólicos foi respectivamente de 10,5-12,8 e 15,7% da totalidade dos vinhos com defeito. Cerca de 6% da totalidade dos vinhos foram rejeitados devido a um, ou mais, defeitos (Goode et Harrop, 2008). Em 2008, destes 10 000 vinhos, cerca de 100 apresentavam fenóis voláteis!

A diminuição da qualidade relacionada com a presença de fenóis voláteis não é percebida apenas pelos profissionais, mas também pelos consumidores, como foi amplamente evidenciado por investigadores australianos (Curtin, 2007).

Nestes dois últimos anos, numerosos investigadores e técnicos centraram os seus estudos neste tema, tendo sido obtidos resultados interessantes, os enólogos tentaram aplicar na prática estas descobertas com o objectivo de melhorarem a prevenção destes aromas indesejáveis. Este artigo apresenta uma revisão sobre os novos conhecimentos e aplicação de práticas actuais.

1/ RISCO DE PRODUÇÃO DE FENÓIS VOLÁTEIS

Um dos trabalhos mais inovadores realizado pela equipa do Prof. *Strehaiano*, em Toulouse, consistiu em medir a velocidade de produção de fenóis voláteis, em função do nível de contaminação com *Brettanomyces*. Ao examinar os resultados (figura 1) constatamos que com uma **população de 10⁴ células por mL** existe tempo suficiente para actuar, ou seja, se por exemplo, o vinho estiver em estágio, uma simples trasfega permite eliminar uma boa parte destas leveduras de contaminação indesejadas.

Se a FML (Fermentação Maloláctica) espontânea não ocorrer, poderá ser feita uma inoculação com bactérias seleccionadas, neste caso, no final da FML, após a trasfega e adição de SO₂, as *Brettanomyces* terão na maioria dos casos desaparecido. Com este nível de população, os enólogos têm tendência para efectuar uma acção correctiva (filtração, centrifugação, nova adição de SO₂), o que não é realmente necessário (serão necessários 50 meses para atingir o limite de detecção, normalmente admitido, de 500 µg/L).

Um controlo microbiológico regular pode ser suficiente e poderá permitir aos enólogos actuar de forma adequada. Apenas no momento do engarrafamento, este nível de população é obviamente demasiado elevado (aqui o objectivo é obter o resultado de zero células ...).

Por outro lado, com uma população de **10⁷ células por mL**, serão necessários menos de 3 dias para atingir o limite de detecção, por conseguinte é **urgente agir!!!** (ver parágrafo 3).

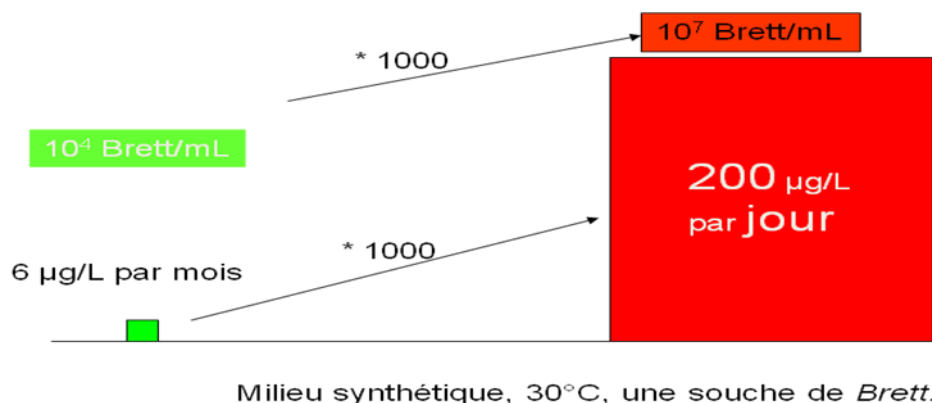


Figura 1: velocidade de produção do 4-etilfenol em função do nível de contaminação com *Brettanomyces*

Estes dados foram obtidos a 30°C em meio sintético; na adega no vinho, as velocidades serão certamente inferiores, mas é a ordem de grandeza que deve ser considerada.

Um controlo microbiológico regular permite de forma preventiva detectar a multiplicação de *Brettanomyces* e de seguida actuar antes que se atinja este nível de contaminação elevado e de grande risco.

Contudo, existem ainda algumas zonas de sombra, nomeadamente no que diz respeito à origem destas multiplicações de *Brettanomyces*, que afectam mais determinados vinhos do que outros. Foi possível observar vinhos com contaminação, que não conduziram ao aparecimento de fenóis voláteis, mesmo na presença de estirpes produtoras. Isto pode ser explicado pela disponibilidade de precursores, mas ainda não foi demonstrado.

Constatamos também, a presença de estirpes que não produzem fenóis (aproximadamente 20% das estirpes, em média). Estas duas observações mostram o interesse em utilizar um teste de detecção microbiológico que recorre ao “sniffing” (Couto, 2003 e Gerland, 2006) e permite detectar especificamente as estirpes que produzem fenóis voláteis. (ver parágrafo 2).

2/ QUAIS AS TÉCNICAS DE CONTROLO MICROBIOLÓGICO A UTILIZAR ?

2.1. IMPORTÂNCIA DA RECOLHA DA AMOSTRA

Qualquer que seja a técnica de controlo utilizada, o método de recolha da amostra é fundamental. Com efeito, imediatamente após a fermentação alcoólica ou após qualquer acção de movimentação do vinho (bombagem, trasfega e remontagem), as leveduras, como as *Brettanomyces*, precipitam no fundo dos depósitos ou barricas estando na sua maioria presentes nas borras ou na primeira camada que se forma logo acima das borras.

Para a recolha de amostras dos depósitos deve ser utilizada a válvula de baixo, em vez da torneira de prova, no caso das barricas a amostra deve ser retirada imediatamente acima das borras. Na região de *Beaune*, o IFV desenvolveu um kit colector de amostras constituído por uma seringa, um tubo de silicone (tamanho estudado para atingir o fundo da barrica) e um tubo inox que permitirá tocar no fundo da barrica (figuras 1, 2 e 3).

Este método permite recolher as *Brettanomyces* do meio onde elas estão concentradas e evita movimentação (*battonâge*), técnica que favorece o seu desenvolvimento (arejamento, dispersão por toda a barrica). Deve ser utilizado um kit por barrica o que acelera o trabalho de recolha das amostras (deixando de ser necessário esterilizar o *argal* com água a ferver

entre a recolha de 2 amostras) os kits utilizados podem seguidamente ser higienizados e esterilizados para utilização posterior.

Figura 1



Figura 2



Figura 3



Figuras 1, 2 e 3: kit para retirar amostras microbiológicas de barricas

No que concerne ao plano de recolha de amostras, estas devem ser retiradas em 10 a 20% das barricas de acordo com o número de barricas. As amostras devem ser sempre retiradas das mesmas barricas. Para grandes volumes, poderemos misturar as amostras para controlar primeiro um lote médio e de seguida, se o resultado for positivo, verificar cada amostra separadamente. Neste caso, um método rápido é mais vantajoso (citometria ou PCR quantitativa). As amostras devem ser conservadas em tubos completamente cheios (caso contrário as *Brettanomyces* podem multiplicar-se, mesmo a 4°C).

2.2 AS DIFERENTES TÉCNICAS DE CONTROLO MICROBIOLÓGICO DA *BRETTANOMYCES*

Apesar de nos últimos anos terem surgido novas técnicas o método mais utilizado continua a ser a cultura de colónias em caixas de *Petri*. Esta técnica não é 100% específica mesmo sabendo-se que a maioria dos meios disponíveis contém ciclo-hexamida que inibe a maioria das leveduras excepto as *Brettanomyces*. No entanto, as *Kloeckera* são também resistentes a este antifúngico, assim sendo será importante fazer uma primeira contagem de colónias após 3 dias (*não Brettanomyces*) e de seguida uma segunda contagem após 7-8 dias (*Brettanomyces*).

Esta técnica apresenta diversas desvantagens: a sua duração, o tempo de trabalho que requer (em função da contaminação poderá ser necessário diluir ou filtrar), a detecção

global (inclui estirpes que não produzem fenóis) e a não detecção das células VNC (Viáveis Não Culturáveis) que podem dar origem a resultados falsos negativos, nomeadamente nos 10 dias seguintes a correcção com SO₂.

Três novas técnicas foram amplamente desenvolvidas e aplicadas nestes últimos anos.

PCR quantitativa: esta técnica consiste na extração do ADN das leveduras presentes na amostra e na amplificação com sondas de ADN específicas das *Brettanomyces* usando um aparelho denominado “thermocycler” (figura 4). O ADN é de seguida quantificado através das curvas de calibração previamente definidas por comparação da técnica de PCR e da contagem de colónias em caixa de *Petri*.

- Esta técnica é de grande sensibilidade (1 a 5 germes/mL) e muito específica. Muitas empresas têm os reagentes e equipamento necessários e cerca de uma vintena de laboratórios de enologia no mundo estão equipados com esta tecnologia. Os resultados podem ser obtidos no próprio dia. Contudo, existem 2 desvantagens: o custo (custo do equipamento ronda os 30 000 € a 50 000€, e reagentes aproximadamente 30 €/análise) e o risco de detectar falsos positivos (o ADN ainda presente nas células prestes a morrer ou nas células mortas – casos registados nos EUA em vinhos tratados com *Velcorin* nos quais o PCR deu resultados positivos várias semanas após o tratamento, enquanto as outras técnicas indicaram mortalidade total das *Brettanomyces*).

Figura 4 : *Thermocycler* utilizado na técnica PCR quantitativa



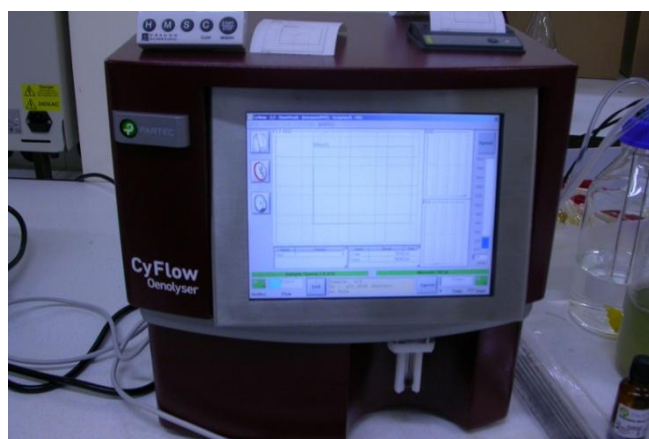
Citometria de fluxo: esta técnica permite quantificar a actividade esterase das leveduras viáveis e permite fazer a contagem das leveduras com precisão, conhecer o seu tamanho e a sua viabilidade. Tem a vantagem de ser uma técnica muito rápida (10 min. de incubação, 3 min. de medição) e detectar as células viáveis não culturáveis (VBNC) Com esta técnica também é possível efectuar testes para determinar a quantidade de SO₂ a adicionar para eliminar uma pequena contaminação.

No entanto, o método não é específico para a *Brettanomyces*, por conseguinte é necessário esperar até ao final da fermentação alcoólica para efectuar os primeiros controlos utilizando o método de colheita de amostra previamente descrito durante o estágio (para não retirar as leveduras do véu presentes na superfície do vinho). É de notar que esta técnica é utilizada há alguns anos nomeadamente em *Champagne* para controlo dos mostos, mas foi apenas a partir do importante trabalho levado a cabo pelo “Institut Français de la Vigne et du Vin” (Gerbaux, 2007 e 2009), que esta técnica começou a ser utilizada na prevenção e controlo de *Brettanomyces*.

O custo do equipamento (exemplo figura 5) é de aproximadamente 22 000 €, os reagentes têm um custo de 5 €/análise; a empresa **Partec** desenvolveu recentemente um método que combina a **citometria** e **PCR**: primeiro é efectuada uma análise por citometria, depois as amostras que apresentem resultados positivos são analisadas com PCR, através da extracção/amplificação clássica (thermocycler) seguida de uma análise simples e precisa por citometria (o ADN é anexado às esferas depois de amplificado).

A duração da análise é similar ao tempo necessário para efectuar a Q-PCR (8 horas), mas o custo é inferior (7500 € para equipamento suplementar, e aproximadamente 10 €/análise para reagentes específicos). A associação destas 2 técnicas permite obter um resultado mais completo que a Q-PCR dado que é possível obter a viabilidade e a especificidade ao mesmo tempo (quer pertença ou não à espécie da *Brettanomyces bruxellensis*).

Figura 5 : Citometria de fluxo



- **Meio líquido de Sniff'brett:** um meio que contém todos os elementos nutritivos para o desenvolvimento das leveduras e ciclo-hexamida (para inibir as não *Brettanomyces*, como nos meios sólidos), mas também uma grande quantidade de ácido p-cumárico precursor do 4-etil-fenol. Desde que as *Kloeckera* não produzam fenóis, este teste é altamente específico.
- De acordo com o protocolo, inocular com 20 mL de vinho ou mosto e de seguida verificar todos os dias, durante 10 dias (a 30°C), ou 14 dias (a 20° C) o aparecimento de uma turvação e de aroma fenólico característico (muito forte). Existe então uma correlação entre o número de dias necessários para aparecimento do aroma fenólico e a quantidade de *Brettanomyces* inicialmente presente no vinho: 2 dias para 10⁶ células/mL, 6 dias para 10³ células/mL, 10 dias para 1 célula/mL.
- Esta técnica oferece diversas vantagens: diminuição dos custos e do trabalho envolvidos (não é necessária diluição ou filtração, o meio está pronto a utilizar), detecção específica das estirpes que produzem fenóis, melhor detecção das VBNC do que num meio sólido (observações de Gerland et al., assim como de Oleofse et col.), rapidez em caso de forte contaminação e a possibilidade de trabalhar com mosto ou amostras retiradas durante a FA. Por outro lado, é uma técnica menos precisa que a técnica de plaqueamento (precisão de +/- 50% contra +/- 20% precisão respectivamente).

- Finalmente, esta técnica pode ser utilizada para controlar a contaminação com *Brettanomyces* da madeira das barricas de carvalho, raspando com um tubo de aço inoxidável o interior das barricas e depois inocular o Sniff'Brett com as aparas recuperadas (da figura 4 à 9). Nas adegas, este método permitiu otimizar significativamente os procedimentos de limpeza - desinfecção das barricas utilizadas na adega, que continham vinhos com aromas fenólicos.

Figura 4 a 9 : Procedimento de controlo microbiológico das barricas com Sniff'Brett

1/ Raspagem do interior das barricas



2/ Recuperação das aparas através do batoque da barrica num tabuleiro estéril



3/ Inoculação das aparas no meio líquido de Sniff'Brett seguida da incubação



A tabela 1 resume a performance dos diferentes testes.

Tabela 1: Performance dos diferentes métodos microbiológicos de detecção da *Brettanomyces*

Técnica	Especificidade	Sensibilidade	Rapidez	Custo por análise (€) **
Meio de cultura sólido	+	++	7 dias	20 - 25
Meio de cultura líquido (<i>Sniff Brett</i>)	++	++	1 a 10 dias	15 - 20
PCR quantitativa	+++	+++	8 horas	85 - 125
Citometria simples	+	+	15 minutos	20 - 25
Citometria associada PCR	+++	++	8 horas	40 - 50

Legenda: +++ muito bom, ++ bom, + médio, - mau

** preço proposto pelos laboratórios em França

3/ PRÁTICAS ENOLÓGICAS PARA PREVENÇÃO E REMOÇÃO DA *BRETTANOMYCES*

Se fizermos uma abordagem deste problema em todos os momentos, ou seja desde que as uvas entram no depósito até ao momento do engarrafamento, é possível intervir a diversos níveis e com diferentes técnicas.

Se escolhermos parcelas de risco idêntico (histórico, parcelas húmidas, parcelas atacadas pela *Botrytis*,...), as doses de adição de azoto devem ser aumentadas e a fermentação alcoólica deve ser iniciada o mais depressa possível com uma nutrição razoável da levedura para assegurar um rápido início e um bom fim da FA, seguida por uma rápida FML com uma pequena clarificação e uma trasfega entre as 2 fermentações.

Se forem detectadas *Brettanomyces* nos vinhos em depósito ou durante a FA, é fortemente aconselhado reduzir o tempo de maceração e após a desencuba passar para um depósito pulmão durante 2 a 3 dias antes de trasfegar os vinhos para as barricas. As borras devem ser removidas para diminuir a quantidade de *Brettanomyces*. Estas borras poderão ser analisadas e reutilizadas se não estiverem contaminadas.

Durante estas primeiras fases, a técnica de controlo mais vantajosa é a cultura em meio de *Sniff Brett*. Em caso de forte contaminação ($>10^5$ células por mL e células em multiplicação rápida), a única técnica utilizável para as eliminar nesta fase é a *flash*-pasteurização. Esta técnica é muito eficaz e muito utilizada, em França, neste tipo de problemas. A passagem do vinho por uma temperatura de 75°C durante alguns segundos elimina todas as *Brettanomyces*, sem impacto perceptível nos aromas do vinho.

Oferecido por empresas de serviços externos, os tratamentos têm um custo de aproximadamente 5 €/hL. É necessário trabalhar em condições de higiene, especificamente nos depósitos de recepção, porque em geral os vinhos podem ser facilmente recontaminados (destruição também das toxinas, um meio certamente propício ao redesenvolvimento das leveduras e das bactérias).

Durante a FML e durante a fase de estágio poderemos utilizar a centrifugação para fazer diminuir a concentração de *Brettanomyces*, que funciona bem com as contaminações não muito importantes ($<10^5$ células por mL). Para diminuir a população de *Brettanomyces* pode também ser utilizada a microfiltração tangencial ou a filtração por terras diatomáceas (melhores resultados com a filtração tangencial).

É necessário referir que estas 2 técnicas de filtração não são totalmente esterilizantes, mas nesta fase, são técnicas menos penalizadoras para o vinho do que a filtração frontal, apesar disso surgiram recentemente novos meios de filtração muito interessantes (à base de celulose) que mostraram ser eficientes na redução de contaminações microbiológicas para as porosidades mais elevadas (mecanismos de adsorção de germes no meio filtrante).

A colagem é uma operação que diminui (de 2 a 3 logaritmos) a população de *Brettanomyces* (ML. Murat). Durante o estágio, as trasfegas mais frequentes favorecem também a diminuição da carga microbiana.

O SO₂ é também muito utilizado no combate ao desenvolvimento das *Brettanomyces*. O valor letal de SO₂ molecular é de 0,825 mg/L (Boulton), o que corresponde a uma concentração em SO₂ livre de 75 mg/L para um pH de 3,75. Razão pela qual, não é possível considerar o SO₂ como um meio de eliminação das *Brettanomyces*.

Para limitar o seu desenvolvimento, os valores variam entre 0,4 e 0,6 mg/L de segundo alguns autores. Na Austrália, são aconselhados os valores de 0,6 mg/L, que corresponde a uma concentração em SO₂ livre de 30 mg/L (aceitável) mas de 55 mg/L para um pH de 3,5. Os valores não são compatíveis com a elaboração de vinhos de qualidade na Europa. O tratamento clássico na Austrália com 7 g/hL adicionados normalmente no fim da FML. Os australianos e os americanos reconsideraram cada vez mais as estirpes das *Brettanomyces* resistentes às elevadas concentrações em SO₂, (Curtin, 2007 et Edwards, 2006). Além disso, será necessário considerar outras técnicas preventivas para limitar as adições de SO₂ ao que é estritamente necessário e no momento adequado (engarrafamento).

A higiene das barricas e a dificuldade de remoção da *Brettanomyces*, que contém vinho com odor fenólico representa o maior desafio. O vapor é certamente a técnica de esterilização mais eficaz como foi demonstrado em vários estudos de Malfeito Ferreira (2004). Foram efectuados vários ensaios de optimização de tratamentos combinando a limpeza com água sob pressão (canne Mog) e esterilização utilizando um gerador a vapor. O tempo de tratamento foi significativamente aumentado comparado com o habitual.

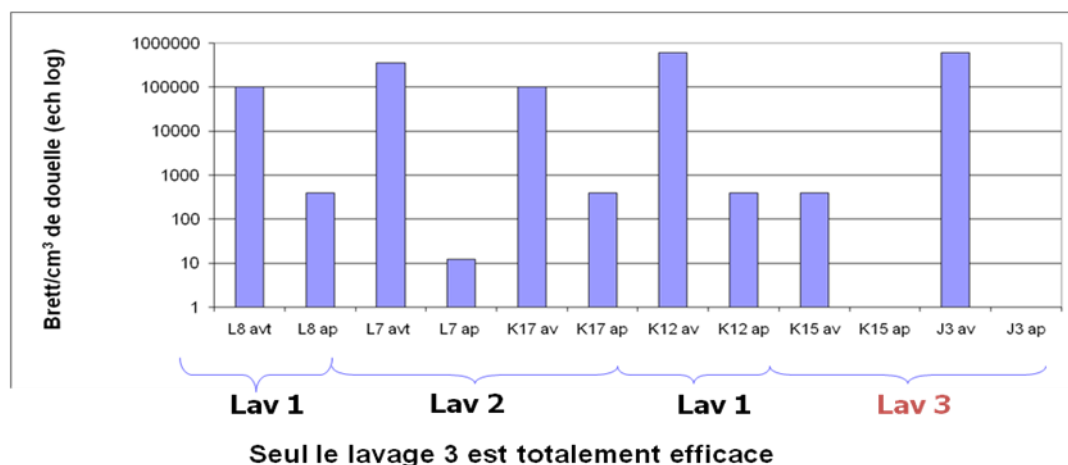
Um exemplo é mostrado na tabela 2, figura 2. Depois deste desafio estar resolvido, é mais fácil gerir as contaminações. Existem outros tratamentos (produtos químicos, ozono) mas será necessário efectuar testes para os adaptar às suas condições. A água ozonada é muito utilizada (EUA, Austrália, Nova Zelândia). Contudo, foi demonstrado que o ozono não penetra a madeira e conseqüentemente pode apenas ser utilizado como tratamento de higiene complementar. O tratamento com ozono sob a forma de gás é mais eficaz, mas constitui uma prática perigosa para o enólogo implementar.

Tabela 2: diferentes procedimentos de limpeza-desinfecção incluindo a utilização de vapor.

	Procedimento 1	Procedimento 2	Procedimento 3
Água	1min	1min	1min
Vapor	2min	3min	6min
Água em elevada pressão	2min	2min	5min
Vapor	6min	10min	10min
Água	2min	2min	2min

Figura 2: contaminação com *Brettanomyces* nas barricas antes e após a lavagem e desinfecção de acordo com os procedimentos da tabela 2 (av = antes do tratamento, ap = após tratamento).

Brett / cm³ de bois



Existem também técnicas de regeneração das barricas, utilizando micro-ondas ou um tratamento com sílica, esta última técnica (*Barena technique*) é mais recente e parece dar bons resultados inclui a remoção de aproximadamente um centímetro de madeira, seguida de uma esterilização a vapor e uma adição de SO₂ final.

No momento do engarrafamento, não podemos falar de uma diminuição da contaminação. Nesta fase é necessário eliminar totalmente as *Brettanomyces*. É fundamental assegurar a ausência de *Brettanomyces* para prevenir um provável desenvolvimento nas garrafas e efectuar um controlo microbiológico num volume de vinho de 750 mL. Nesta fase o meio de cultura é a técnica mais segura. Para eliminar as *Brettanomyces* detectadas são utilizadas duas técnicas: filtração e tratamento DMDC (dimetilo dicarbonato ou Velcorin - a única marca disponível).

É de salientar que este tratamento, permitido pela OIV, está restringido, na Europa, a vinhos com mais de 5g/L de açúcar (até ao momento) e por conseguinte não pode ser utilizado na maioria dos vinhos tintos.

Contudo, é altamente eficiente e muito utilizado nos EUA. Actua muito rapidamente e decompõe em poucas horas numa pequena quantidade de metanol e CO₂. Tem a vantagem de esterilizar não só o vinho, mas também a enchedora e a garrafa. É muito importante efectuar uma boa limpeza e desinfecção da enchedora e do circuito (filtros, tubagens), para prevenir a formação de biofilmes contaminados com *Brettanomyces* (já referido pelo autor).

Relativamente à filtração estéril, será necessário fixar em 0,65 µm no máximo, as porosidades superiores deixam passar as células de *Brettanomyces* (Renouf, 2007). Alguns autores falam de células ainda mais pequenas (nomeadamente as VBNC), pelo que durante o processo de vinificação e estágio é essencial prevenir, o mais cedo possível, o crescimento das *Brettanomyces* para garantir uma segurança final.

Finalmente, se os produtores optarem por não aplicar estes tratamentos aos seus vinhos (frequente nos "Grands Crus de Bourgogne", "Vallée du Rhône", "Bordeaux"), as garrafas devem ser conservadas a uma temperatura abaixo dos 13°C, porque permite reduzir muito mais a possibilidade de contaminação e aromas fenólicos, do que a conservação a 18°C ou mais (Gerbaux, 2008).

Conclusão

Com a acessibilidade a estas novas técnicas, os enólogos e outros profissionais do vinho têm agora melhores formas de prevenção dos aromas indesejáveis ligados às *Brettanomyces*. No entanto, é necessário estar extremamente atento e vigilante para implementar os procedimentos de amostragem e controlo que melhor se adaptem à adega, não hesitar em experimentar e combinar as diferentes técnicas, aproveitando a sua própria experiência.

É possível, como o autor já o fez em várias adegas (assim como outros colegas especialistas) controlar as *Brettanomyces* sem ter de utilizar necessariamente técnicas drásticas de eliminação como a flash-pasteurização ou a filtração esterilizante ou as sulfitações em doses elevadas. É importante envolver todo o “staff” da adega nesta problemática.

Nota do tradutor:

Técnica PCR - (*Polymerase Chain Reaction* - reacção em cadeia pela polimerase)

BIBLIOGRAFIA

J. Goode and S. Harrop, Wine faults and their prevalence: data from the world's largest blind tasting, in 16èmes Entretiens Scientifiques Lallemand, Horsens, 2008

C. Curtin, Sensory perceptions of "Brett" and relationship to consumer preference, in 13ème AWITC, 2007.

D. SALAMEH, C. BRANDAM, W. MEDAWAR, R. LTEIF, P. STREHAIANO - Influence de l'étape de croissance et de la quantité de *Brettanomyces Bruxellensis* sur la production d'éthyl-phénols - 8^{ème} symposium international de viticulture et d'œnologie de Bordeaux, 2007.

A. DELAHERCHE., O. Claisse, A. LONVAUD-FUNEL, Détection et quantification de *Brettanomyces Bruxellensis* par PCR quantitative, 7^{ème} symposium international de viticulture et d'œnologie de Bordeaux, 2003.

A. DELAHERCHE., J.COULON, E. WALLING, A. LONVAUD-FUNEL , Détection et quantification de *Brettanomyces Bruxellensis* par PCR quantitative, 8^{ème} symposium international de viticulture et d'œnologie de Bordeaux, 2007.

L. Massini, F. Remize, H. Tessonniere, B. Bach, L. Barnavon, Quantification de *Brettanomyces* dans les vins – Développement et validation d'une méthode directe, sensible et fiable, par PCR quantitative, Rev. Oenol. Bourg. N°133, Octobre 2009.

V. Gerbaux, Dénombrement rapide de *Brettanomyces* dans un vin rouge par cytométrie de flux, Rev. Oenol. Bourg. N°127, avril 2007.

V. Gerbaux et J. Thomas, Utilisations pratiques de la cytométrie de flux pour le suivi des levures en œnologie, Rev. Fr. d'Oe. N°236, juillet-août 2009.

Couto J.A., Barbosa A., Vieira M., Cabral L. ; Graça A.R., Soares-Franco J.M., Hogg T., Detection of *Brettanomyces/Dekkera* in wines in a liquid culture medium, 7^{ème} symposium international de viticulture et d'œnologie de Bordeaux, 2003.

C. Gerland, Interest of a simple new test for large detection of *Brettanomyces* in winery, 3rd international Enology and Viticulture conference of S.A. Society for Enol. And Vitic., South Africa, 2006.

A. Oleofse, IS. Pretorius, M Du Toit, Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review, S. Afr. J. Enol. Vitic., Vol.29, N°2, 2008.

M.-L. Murat, Prévention du risque *Brettanomyces* par l'utilisation d'outils analytiques innovants et la gestion rigoureuse du process d'élaboration, Rev. Œnol. Bourg., n°121, août 2006.

V. Renouf, M-C. Perello, G. de Revel and A. Lonvaud-Funel, Survival of Wine Microorganisms in the Bottle during Storage Am. J. Enol. Vitic., Sep 2007; 58: 379 - 386.

A. BARATA, J. CALDEIRA, R. BOTELHO, D. PAGLIARA, A. COSTA, MALFEITO-FERREIRA, M. AND LOUREIRO, V. - Effect of different barrique sanitation procedures on yeasts isolated from the inner layers of wood - Annual congress of American Society of Enology and Viticulture – 2004.

R.B. Boulton, V. Singleton, L.F. Bisson and R. Kunkee – Principles and Practices of Winemaking – Chapman and Hall Publishers New York, 1996.

C. Edwards, Spoilage microbes and their detection, what's new ? , 3rd international Enology and Viticulture conference of S.A. Society for Enol. And Vitic., South Africa, 2006.

C. Curtin, J. Bellon, E. Kennedy, M. de Barros Lopes, P. Godden, P. Hensckee - Sulfite tolerance amongst genetically diverse *Brettanomyces bruxellensis* yeast strains isolated from Australian red wines, Australian Wine Industry Technical Conference, Adelaide, 2007.