

# La cytométrie appliquée aux microorganismes du vin / Application of flow cytometry to wine microorganisms

Cédric Longin, Clément Petitgonnet, Michèle Guilloux-Benatier, Sandrine Rousseaux, et Hervé Alexandre

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

**Abstract.** Flow cytometry (FCM) is a powerful technique allowing detection and enumeration of microbial populations in food and during food process. Thanks to the fluorescent dyes used and specific probes, FCM provides information about cell physiological state and allows enumeration of a microorganism in a mixed culture. Thus, this technique is increasingly used to quantify pathogen, spoilage microorganisms and microorganisms of interest. Since one decade, FCM applications to the wine field increase greatly to determine population and physiological state of microorganisms performing alcoholic and malolactic fermentations. We will describe FCM principles and the available techniques allowing quantification of wine microorganisms by FCM using fluorescent dyes. Different examples of FCM analysis regarding monitoring of alcoholic fermentation, malolactic fermentation (total population, viable population, physiological state), specific detection and quantification of spoilage microorganisms like *Brettanomyces* will be presented.

## 1. Cytométrie en flux : vue d'ensemble et principe

La cytométrie en flux (CMF) est considérée comme une étude de cellules isolées dans un flux. La CMF est une technique robuste pour analyser des paramètres multiples de cellules individuelles au sein d'un ensemble hétérogène de microorganismes par exemple. Plusieurs revues et livres ont été publiés traitant du principe de cytométrie en flux et donnant de nombreux détails [1–3].

Brièvement, un cytomètre en flux est composé de trois principaux systèmes : fluide, optique et électronique (Fig. 1).

Le système fluide permet de séparer et d'aligner les particules grâce au liquide de gaine (focalisation hydrodynamique) [1]. Une fois alignées, les particules passent devant un ou plusieurs lasers.

La lumière émise par les cellules, suite à leur irradiation à l'intérieur de la chambre de flux, est dirigée vers les détecteurs par un système complexe de miroirs et filtres qui composent le système optique. La lumière émise aux petits angles est détectée (FSC). Cette mesure est proportionnelle à la taille des cellules. La lumière est également détectée aux grands angles (SSC). Cette dernière est proportionnelle à la complexité à l'intérieur de la cellule ainsi qu'à la granulosité cellulaire. Un autre dispositif est utilisé pour détecter le rayon lumineux à travers un ensemble de filtres séparant la lumière selon la longueur d'onde (filtres de fluorescences).

La lumière passant par le système optique est convertie en signaux électroniques générés par des photodiodes et des tubes photomultiplicateurs (PMT) puis collectés. De récents cytomètres en flux peuvent avoir jusqu'à 12 PMT et ce nombre ne cesse d'augmenter avec le développement des nouvelles technologies (détection spectrale).

## Contexte

Le vin est une matrice complexe contenant de nombreux composés et microorganismes tels que des levures, des bactéries lactiques (BL) et acétiques (BA). Lors de l'élaboration du vin, il est indispensable de connaître les populations réalisant les fermentations mais également la concentration des microorganismes d'altération présents afin d'avoir une bonne qualité finale. Différentes techniques sont disponibles afin de détecter et/ou quantifier ces microorganismes durant les étapes de fermentation et dans le vin produit.

À ce jour, les laboratoires œnologiques utilisent différentes techniques permettant ces détections et quantifications. Premièrement, l'utilisation de boîtes de Pétri sélectives permet d'énumérer les microorganismes cultivables présents dans l'échantillon. Cependant la formation de colonies demande des temps d'incubation long (généralement entre 2 et 10 jours) selon les microorganismes. De plus cette méthode ne permet pas la quantification des microorganismes en état viable mais non cultivable (VNC), retrouvés couramment en vin [4–8].

La quantification par microscopie utilisant les cellules de Thoma ou Malassez est une autre méthode, mais celle-ci est longue, fastidieuse, subjective et avec une limite de quantification d'environ  $10^4$  cellules/mL. Néanmoins, couplée à l'utilisation de marqueurs fluorescents, la microscopie permet de déterminer des fonctions cellulaires spécifiques ou d'identifier les microorganismes présents avec l'utilisation de sondes spécifiques fluorescentes par exemple (Direct Epifluorescence Filter Technique).

D'autres techniques basées sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR), comme la PCR quantitative peut également permettre de détecter et quantifier les microorganismes. En effet, par l'utilisation d'amorces capables de se fixer spécifiquement à des séquences cibles

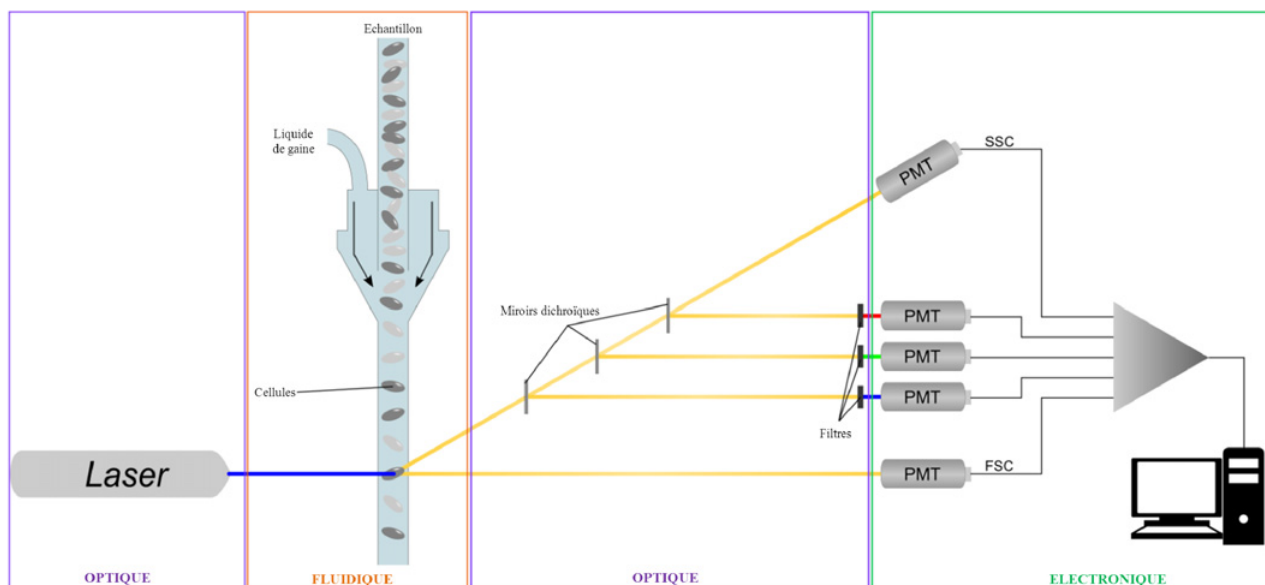


Figure 1. Schéma du principe d'un cytomètre en flux.

d'ADN et l'utilisation d'un intercalant d'ADN (SybrGreen par exemple) ou de sondes spécifiques fluorescentes (sondes TaqMan par exemple), cette technique permet une quantification précise des microorganismes présents. Cependant, cette méthode demande une étape d'extraction d'ADN avant de réaliser la PCR. Celle-ci peut être perturbée par la composition du vin, spécifiquement pour les vins rouges contenant une importante quantité de polyphénols. Ces molécules peuvent s'adsorber au niveau de la paroi cellulaire [9, 10] influençant la lyse cellulaire durant l'extraction de l'ADN et pouvant conduire à un faible rendement d'extraction. De plus, un problème lors de l'amplification de l'ADN peut également intervenir par la présence de composés inhibiteurs tels que les tannins, polysaccharides et pigments [11, 12].

La méthode CMF permet à la fois une détection et une quantification des microorganismes avec rapidité et une forte spécificité. Premièrement, la CMF permet de suivre l'état physiologique des cellules durant la fermentation alcoolique (FA) ou malolactique (FML). De plus, la CMF peut être utilisée plus spécifiquement, c'est-à-dire couplée à la méthode d'hybridation d'une sonde *in situ* en fluorescence (FISH) afin de quantifier certains microorganismes d'altération par exemple. Dans l'optique d'augmenter voire de généraliser l'utilisation de la CMF appliquée au vin, cet article a pour but de référencer les différentes applications utilisées et envisageables de cette technique en œnologie.

## 2. Quantification et analyse de l'état physiologique des microorganismes œnologiques par CMF

L'énumération des bactéries et des levures peut être effectuée par CMF (Fig. 2) sans l'utilisation de marqueurs en milieu de culture et certains vins blancs.

Selon le vin étudié, spécifiquement pour le vin rouge, l'énumération peut être plus difficile par la présence d'une concentration importante de composés détectée par le cytomètre en flux, confondu avec les bactéries et même parfois avec les levures. À ce jour, plusieurs

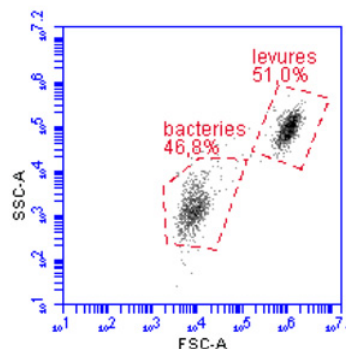


Figure 2. Discrimination des bactéries et des levures par CMF (FSC : taille ; SSC : granulosité) (donnée personnelle).

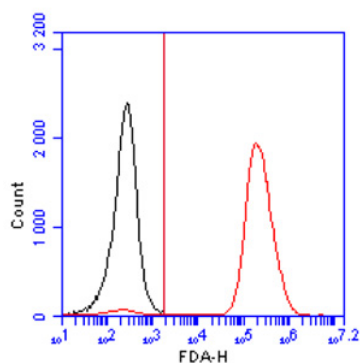
marqueurs fluorescents comme les marqueurs SYTO, non fluorescents jusqu'à leur liaison avec l'ADN, sont disponibles. Le DAPI et les marqueurs SYBR sont également utilisés. Ceux-ci présentent une fluorescence plus importante lorsqu'ils sont liés à l'ADN.

### 2.1. Vitalité cellulaire

Afin de réaliser les fermentations durant l'élaboration du vin, les levures et bactéries doivent être en vie et métaboliquement active. Les marqueurs de vitalité permettent de déterminer les fonctions essentielles vitales comme l'activité enzymatique par exemple. La fluorescéine di-acétate (FDA) est un marqueur couramment utilisé dans de nombreuses applications puisque son utilisation est rapide et simple [13] (Figure 3). En effet, le marquage FDA reflète l'activité enzymatique cellulaire à travers l'activité estérase, mettant en évidence l'activité métabolique cellulaire.

#### 2.1.1. Levures

Ainsi une bonne corrélation entre boîtes de Pétri et CMF avec marquage FDA pour l'énumération de *Saccharomyces cerevisiae* a été mise en évidence [14].



**Figure 3.** Autofluorescence (histogramme noir) et fluorescence après marquage avec le FDA (histogramme rouge) d'une population de levures lors d'un passage au cytomètre en flux. (donnée personnelle).

Le carboxy-FDA (cFDA) peut également être utilisé car la fluorescéine carboxylée présente une meilleure rétention au sein de la cellule. Le marqueur FUN-1 [7] permet également d'analyser la vitalité cellulaire. Celui-ci pénètre dans les cellules et entraîne une fluorescence verte du cytoplasme. Lorsque les levures sont actives métaboliquement, des structures intra-vacuolaires cylindriques se forment et présentent une fluorescence rouge.

### 2.1.2. Bactéries

Concernant les bactéries, une quantification de *O. oeni* en vin rouge durant la FML a été menée par dénombrement classique (boîtes de Pétri) et CMF en testant 4 marqueurs différents : Rhodamine 123 ; Calcein acétoxyméthyl ester (Calcein-AM) ; 2', 7'-bis-carboxyethyl -5(6)-carboxyfluorescéine acétoxyméthyl ester (BCECF-AM) et FDA [14]. Des différences d'intensité de fluorescence selon les marqueurs et les souches testées ont été mises en évidence. La majorité des souches étaient marquées avec la FDA. Cependant, 40 % des *O. oeni* sont fluorescentes après 10–15 min, 30 % après 60 min, et deux souches ne sont pas marquées, traduisant probablement une fuite de la fluorescéine vers le tampon à travers la membrane entraînant ainsi une perte de fluorescence des cellules. Ce problème conduit à une différence significative lors de l'énumération de *O. oeni* en vin Bardolino entre les boîtes de Pétri et la CMF. En vin blanc, la quantification semble possible avec la FDA [15]. Cependant, une autre étude a mise en évidence une faible corrélation entre les boîtes de Pétri et la CMF en utilisant la FDA lors de la phase de latence et en fin de croissance en milieu de culture [4].

Pour le marquage FDA, il est important de rappeler que les estérases intracellulaires présentent une activité maximum à pH 7,6, à 30 °C après une incubation de 20 min.

En vin rouge, différents marqueurs de vitalité ont été testés mais aucun ne s'est montré satisfaisant afin de quantifier la vitalité bactérienne au cours de la FML.

## 2.2. Viabilité cellulaire

Les marqueurs de viabilité déterminent si les cellules sont dans un état physiologique permettant leur survie, comme

la mesure de la perméabilité membranaire. L'iodure de propidium (IP) est fréquemment utilisé comme marqueur d'intégrité membranaire [16]. L'IP rentre dans les cellules perméables et se fixe à l'ADN. Les cellules présentent alors une fluorescence rouge. Cependant, l'utilisation de ce marqueur présente un important désavantage. Différents stress comme l'éthanol sont connus pour entraîner une augmentation de la perméabilité membranaire [17] et donc biaiser le résultat, voire rendre fluorescente des cellules vivantes [18].

### 2.2.1. Levures

Différentes études ont utilisé l'IP pour suivre la sédimentation cellulaire [19] et suivre la population levurienne durant la FA en moût synthétique [6, 16, 20]. De bonnes corrélations ont été mises en évidence. D'autres études ont été effectuées en moûts blanc et rouge [21, 22]. Une sous population a été révélée, appelée «population fragile» qui présentait une perméabilité durant la FA mais cet état était réversible.

### 2.2.2. Bactéries

La quantification de *O. oeni* a été menée durant la FML. La discrimination entre les bactéries vivantes et mortes en vin rouge est parfois impossible, liée à la présence de débris en grande quantité. Une étude a toutefois démontré que cette quantification était possible par un double marquage [15]. Ces marqueurs, comme ceux cités précédemment, sont non spécifiques, c'est-à-dire que si l'échantillon contient différentes bactéries, il n'est pas possible d'affiner l'analyse à une sous population. Cependant, lors de la FML, il est très probable que cette quantification soit majoritairement celle de bactéries lactiques, voire exclusivement *O. oeni*.

## 2.3. Double marquage vitalité / viabilité

### 2.3.1. Levures

Le suivi de la FA de cidres a été réalisé en utilisant les marqueurs CV6, IP et DRAQ5 afin de quantifier la vitalité, la viabilité et la population totale présente. Des cellules doublement marquées ont été ainsi détectées (fonction vitale active mais avec une importante perméabilité membranaire) [23]. Ces résultats ont ensuite été confirmés dans une autre étude [24].

### 2.3.2. Bactéries

L'analyse de la rétention de la carboxy-fluorescéine ainsi que l'exclusion de l'IP a été réalisée pour *O. oeni* adaptée ou non à l'éthanol en milieu de culture [25]. Les mesures de fluorescence ont été menées suite à un stress éthanol 16 % (v/v) ou sans stress. Les résultats ne montrent aucune différence significative entre les fluorescences en l'absence de stress alors que suite à l'application du stress éthanol, la fluorescence de la fluorescéine diminue de 25 % et celle de l'IP augmente de 80 %. En revanche, lorsque les cellules sont préalablement adaptées à l'éthanol, le stress éthanol 16 % (v/v) entraîne un impact cellulaire moins important. Des doubles marquages ont également été réalisés lors d'un suivi de FML [26]. Cependant, dans une étude [25] ils ont démontré que l'intensité de fluorescence

augmente entre 15 min et 60 min contrairement à une étude précédente [14]. Il est donc important d'avoir connaissance de ces potentiels biais qui peuvent intervenir lors d'analyses d'échantillons issus du vin.

#### 2.4. Etat viable mais non cultivable (VNC)

La technique de CMF permet également de mettre en évidence l'état VNC en utilisant un marqueur de vitalité ainsi que le dénombrement sur boîtes de Pétri.

##### 2.4.1. Levures

Par CMF, le SO<sub>2</sub> a été décrit comme un facteur conduisant à l'entrée en état VNC pour *Brettanomyces bruxellensis* [8] et *S. cerevisiae* [7,27]. Les marqueurs de vitalité sont actifs alors qu'aucune colonie n'est détectée sur milieu sélectif.

##### 2.4.2. Bactéries

Ce même état VNC a été observé chez *O. oeni* par CMF lors de la FML dans un milieu caractérisé par un faible pH, en présence d'éthanol et un déficit en nutriments [23].

#### 2.5. Autres applications

Bien que l'utilisation des marqueurs de viabilité et vitalité soient les principaux utilisés afin de suivre la FA ou la FML dans différentes matrices, d'autres marqueurs fluorescents existent et permettent d'obtenir des informations supplémentaires sur l'état physiologique des cellules.

L'analyse du cycle cellulaire, le potentiel membranaire, la présence d'espèces réactives à l'oxygène, la concentration en lipides intracellulaires, le pH intracellulaire peut être ainsi mesuré [13].

### 3. Enumeration spécifique des microorganismes du vin

#### 3.1. Utilisation des anticorps spécifiques

L'utilisation d'anticorps spécifiques permet de quantifier spécifiquement *S. cerevisiae* en moût [28]. Afin de réaliser le marquage, une incubation du moût en fermentation avec un premier anticorps polyclonal anti-*Saccharomyces* est effectuée puis un second anticorps couplé à un fluorochrome est utilisé. Il est également possible de suivre la population de *O. oeni* réalisant la FML en même temps que la FA en moût de Chardonnay [28]. Cette méthode a également été développée afin de quantifier *B. bruxellensis* en vin rouge lors de l'élevage [29].

#### 3.2. Utilisation d'une sonde oligonucléotidique

La technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) peut être couplée à la CMF. La FISH est utilisée depuis de nombreuses années [30] mais la visualisation de la fluorescence était principalement effectuée par microscopie avant d'être combinée à la CMF il y a une dizaine d'années [31]. Aujourd'hui, de nombreuses espèces présentes en œnologie peuvent être discriminées au sein d'une population globale par l'utilisation d'une sonde oligonucléotidique [13]. *B. bruxellensis* est une levure dont une quantification précise et rapide est

indispensable lors de l'élevage de vin rouge. Plusieurs études se sont donc intéressées à développer une sonde spécifique pour ensuite être appliquée à la CMF [32,33].

### 4. Futures applications

Comme la microscopie, la CMF est également utilisée dans de nombreux domaines. C'est pourquoi de nombreuses applications sont envisageables en œnologie.

L'utilisation d'un marqueur fluorescent spécifique tel que le 1,6-Diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) [34] permettrait d'avoir une information sur la fluidité membranaire des levures et des bactéries en vin, et donc sur leur état physiologique à un instant donné.

L'utilisation de sondes peptidiques (PNA) fluorescentes, non chargées donc plus aptes à pénétrer au sein de la cellule, pourrait permettre la quantification spécifique d'une sous population. Des sondes permettant de quantifier les principales bactéries lactiques du vin sont également connues et pourraient être appliquées.

### 5. Conclusions

La cytométrie en flux est à ce jour encore peu utilisée dans le domaine de l'œnologie. Cependant, de plus en plus d'études sont réalisées afin de développer des outils simples, rapides, fiables avec un faible coût afin de répondre aux différents besoins des vignerons. La matrice vin est très complexe, c'est donc pour cela que la plupart des protocoles développés dans d'autres matrices ne sont pas directement applicables aux échantillons du chai. C'est pourquoi il est nécessaire de mener d'autres études qui conduiront, à terme, à rendre la CMF indispensable lors d'une analyse microbiologique en œnologie.

### References

- [1] Díaz, M., Herrero, M., García, L.A., Quirós, C.: Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochem. Eng. J.* **48**, 385–407 (2010)
- [2] Longobardi-Givan, A.: *Flow Cytometry: First Principles*. John Wiley & Sons (2013)
- [3] O'Neill, K., Aghaeepour, N., Špidlen, J., Brinkman, R.: *Flow Cytometry Bioinformatics*. *PLoS Comput Biol.* **9**, e1003365 (2013)
- [4] Bouix, M., Ghorbal, S.: Rapid enumeration of *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation by flow cytometry. *J. Appl. Microbiol.* **114**, 1075–1081 (2013)
- [5] Bouix, M., Leveau, J.-Y.: Rapid assessment of yeast viability and yeast vitality during alcoholic fermentation. *J. Inst. Brew.* **107**, 217–225 (2001)
- [6] Branco, P., Monteiro, M., Moura, P., Albergaria, H.: Survival rate of wine-related yeasts during alcoholic fermentation assessed by direct live/dead staining combined with fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Food Microbiol.* **158**, 49–57 (2012)
- [7] Salma, M., Rousseaux, S., Sequeira-Le Grand, A., Divol, B., Alexandre, H.: Characterization of the Viable but Nonculturable (VBNC) State in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE.* **8** (2013)
- [8] Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., Alexandre, H.: Characterization of the “viable but nonculturable”



- (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. Food Microbiol. **30**, 438–447 (2012)
- [9] Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Colomo, B., Suárez, J.A.: Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. Eur. Food Res. Technol. **220**, 341–346 (2004)
- [10] Razmkhab, S., Lopez-Toledano, A., Ortega, J.M., Mayen, M., Merida, J., Medina, M.: Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. J. Agric. Food Chem. **50**, 7432–7437 (2002)
- [11] Rossen, L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., Rasmussen, O.F.: Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. Int. J. Food Microbiol. **17**, 37–45 (1992)
- [12] Wilson, I.G.: Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl. Environ. Microbiol. **63**, 3741 (1997)
- [13] Longin, C., Petitgonnet, C., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., Alexandre, H.: Application of flow cytometry to wine microorganisms. Food Microbiol. **62**, 221–231 (2017)
- [14] Malacrino, P., Zapparoli, G., Torriani, S., Dellaglio, F.: Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. J. Microbiol. Methods. **45**, 127–134 (2001)
- [15] Salma, M., Rousseaux, S., Sequeira-Le Grand, A., Alexandre, H.: Cytofluorometric detection of wine lactic acid bacteria: application of malolactic fermentation to the monitoring. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **40**, 63–73 (2013)
- [16] Delobel, P., Pradal, M., Blondin, B., Tesniere, C.: A “fragile cell” sub-population revealed during cytometric assessment of *Saccharomyces cerevisiae* viability in lipid-limited alcoholic fermentation. Lett. Appl. Microbiol. **55**, 338–344 (2012)
- [17] Alexandre, H., Rousseaux, I., Charpentier, C.: Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. FEMS Microbiol. Lett. **124**, 17–22 (1994)
- [18] Davey, H.M., Hexley, P.: Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. Environ. Microbiol. **13**, 163–171 (2011)
- [19] Gerbaux, V., Thomas, J.: Utilisations pratiques de la cytométrie de flux pour le suivi des levures en œnologie. Rev. Fr. Oenologie (2009)
- [20] Mannazzu, I., Angelozzi, D., Belviso, S., Budroni, M., Farris, G.A., Goffrini, P., Lodi, T., Marzona, M., Bardi, L.: Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: Cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. Int. J. Food Microbiol. **121**, 84–91 (2008)
- [21] Chaney, D., Rodriguez, S., Fugelsang, K., Thornton, R.: Managing high-density commercial scale wine fermentations. J. Appl. Microbiol. **100**, 689–698 (2006)
- [22] Farthing, J.B., Rodriguez, S.B., Thornton, R.J.: Flow cytometric analysis of *Saccharomyces cerevisiae* populations in high-sugar Chardonnay fermentations. J. Sci. Food Agric. **87**, 527–533 (2007)
- [23] Herrero, M., Quirós, C., García, L.A., Díaz, M.: Use of flow cytometry to follow the physiological states of microorganisms in cider fermentation processes. Appl. Environ. Microbiol. **72**, 6725–6733 (2006)
- [24] Monthéard, J., Garcier, S., Lombard, E., Cameleyre, X., Guillouet, S., Molina-Jouve, C., Alfenore, S.: Assessment of *Candida shehatae* viability by flow cytometry and fluorescent probes. J. Microbiol. Methods. **91**, 8–13 (2012)
- [25] Da Silveira, M.G. da, Romão, M.V.S., Loureiro-Dias, M.C., Rombouts, F.M., Abee, T.: Flow cytometric assessment of membrane integrity of ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. Appl. Environ. Microbiol. **68**, 6087–6093 (2002)
- [26] Amor, K.B., Breeuwer, P., Verbaarschot, P., Rombouts, F.M., Akkermans, A.D.L., Vos, W.M.D., Abee, T.: Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead *Bifidobacterium* cells during bile salt stress. Appl. Environ. Microbiol. **68**, 5209–5216 (2002)
- [27] Divol, B., Du Toit, M., Duckitt, E.: Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol. **95**, 601–613 (2012)
- [28] Rodriguez, S. b., Thornton, R. j.: Use of flow cytometry with fluorescent antibodies in real-time monitoring of simultaneously inoculated alcoholic-malolactic fermentation of Chardonnay. Lett. Appl. Microbiol. **46**, 38–42 (2008)
- [29] Chaillet, L., Martin, G., Genty, V.: Mise au point d’une méthode de détection des *Brettanomyces* par immunocytométrie. AFC (2014)
- [30] Wallner, G., Amann, R., Beisker, W.: Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. Cytometry. **14**, 136–143 (1993)
- [31] Inácio, J., Behrens, S., Fuchs, B.M., Fonseca, Á., Spencer-Martins, I., Amann, R.: *In situ* accessibility of *Saccharomyces cerevisiae* 26S rRNA to cy3-labeled oligonucleotide probes comprising the D1 and D2 domains. Appl. Environ. Microbiol. **69**, 2899–2905 (2003)
- [32] Serpaggi, V., Remize, F., Sequeira-Le-Grand, A., Alexandre, H.: Specific identification and quantification of the spoilage microorganism *Brettanomyces* in wine by flow cytometry: A useful tool for winemakers. Cytometry A. **77A**, 497–499 (2010)
- [33] Röder, C., König, H., Fröhlich, J.: Species-specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA. FEMS Yeast Res. **7**, 1013–1026 (2007)
- [34] Müller, S., Ullrich, S., Lösche, A., Löffhagen, N., Babel, W.: Flow cytometric techniques to characterise physiological states of *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Microbiol. Methods. **40**, 67–77 (2000)