

Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare dell'Università di Bologna, Italia

Recherche sur l'étiologie d'une nouvelle maladie de la grappe: la pourriture acide ¹⁾

par

ROSA MARCHETTI, M. ELISABETTA GUERZONI et M. GENTILE

Research on the etiology of a new disease of grapes: sour rot

S u m m a r y . — The species of the yeasts associated with sour rot and the frequency of their isolation were determined. The most frequent genera were *Candida*, *Pichia* and *Hanseniaspora*. Species belonging to these genera were able to induce the symptoms of the disease *in vivo* when inoculated into table grapes. However, other species less frequent have also been found able to induce the rot *in vitro* and to reproduce GLC profiles of volatile compounds of head space very similar to those of naturally infected grapes. The extracellular lytic enzyme activity of isolated strains and their frequency in the population of infected grapes were studied.

Introduction

La manifestation des diverses infections phytopathogènes est sujette à des procès évolutifs qui dépendent de nombreux facteurs tels que le choix des pratiques culturelles et des traitements chimiques, spécialement antiparasitaires. Ces interventions peuvent altérer l'équilibre numérique des populations microbiennes et, par conséquent, en modifier dans le temps les complexes relations interactives directes et indirectes. Un phénomène qui pourrait être interprété selon cette optique est l'apparition ou la mise en évidence d'une «nouvelle» maladie de la vigne appelée «pourriture acide», non fortuitement associée à l'amélioration du contrôle chimique de l'incidence des attaques de *Botrytis cinerea*. Cette maladie, signalée en Italie par BISIACH *et al.* (1981, 1982), GUERZONI et MARCHETTI (1982), GUERZONI *et al.* (1982), est de plus en plus fréquente aussi bien en zones méridionales qu'en zones septentrionales. Elle est reconnaissable par une forte oxydation des grains; ceux-ci présentent une pellicule de plus en plus fragile et perdent leur jus; cette maladie est signalée par une forte odeur d'acide acétique et par une présence constante d'individus de *Drosophila* spp. Les autres modifications chimiques concernent la présence d'acide galacturonique (GUERZONI et MARCHETTI 1982) et une réduction de l'acidité fixe. L'acide gluconique et ses cétoacides sont généralement absents.

Le caractère explosif par lequel la maladie se manifeste, presque exclusivement en phase de maturation avancée, rend difficile l'évaluation de la dynamique du procès et du rôle joué par les diverses espèces microbiennes, presque exclusivement levures, isolées dans et sur les fruits infectés (BISIACH *et al.* 1981, 1982, GUERZONI et MARCHETTI 1982, GUERZONI *et al.* 1982).

Souvent la maladie est incorrectement confondue avec une attaque de *B. cinerea*; en effet souvent des traces de *B. cinerea* reculé sont présentes dans les raisins attaqués; elles pourraient indiquer un rôle des micro-blessures provoquées par le champignon en facilitant la pénétration des agents de la pourriture acide. Des programmes

¹⁾ Étude subventionnée par le Centro Ricerche Viticole ed Enologica (C.R.V.E.), Università di Bologna.

différenciés de défense contre le *B. cinerea* ont mis en évidence des corrélations positives entre l'apparition des deux infections (BISLACH *et al.* 1981, MORANDO *et al.* 1983).

Dans ce travail nous présentons les résultats de 2 années d'expériences, conduites selon deux lignes: 1 — identification des agents étiologiques de la maladie et 2 — recherche des mécanismes biochimiques favorisant le procès de pénétration dans les tissus de l'hôte.

Matériel et méthodes

Isolements et comptages de la population microbienne

Les isolements ont été effectués dans des localités et sur des cépages divers de raisins de table et de cuve. Les grains prélevés un par un, aseptiquement, ont été suspendus en quantité connue de solution physiologique et traités à ultra-sons selon MARTINI *et al.* (1980).

Milieu d'isolement: Sabouraud Difco.

Pour l'identification des levures nous avons employé la méthode de BARNETT *et al.* (1979) ou elles ont été identifiées par la C.B.S.

Inoculations artificielles: Les inoculations sur les cépages de table Thompson Seedless, Sultanina Muscato, Sultanina Nera, Fiesta, Delight, Apirene Bruna, Palieri ont été effectuées à la floraison par pulvérisation de suspensions de levures en solution physiologique (10^4 cellules/ml) sur toute la surface de chaque plante.

Les inoculations en laboratoire ont été effectuées séparément sur des grains détachés, stérilisés avec hypochlorite, sans ou avec micro-blessures. Nous avons employé 4 échantillons de raisins de table de l'Afrique du Sud. Pendant l'incubation nous avons contrôlé la température et l'humidité relative.

Analyse GLC de l'espace de tête: Pour les milieux liquides 5 ml de culture ont été additionnés de 5 g de Na_2SO_4 anhydre et conditionnés à 60 °C pendant 10 min. Nous avons injecté 500 μl de la vapeur de l'espace de tête. Conditions analytiques: Modèle C. Erba 4160 HRGC, colonne capillaire en verre (40 m \times 0,3 mm) recouverte sur la surface intérieure d'un film (0,1—0,15 μm) de la phase stationnaire FFAP; température de la chambre 35 °C.

Pour les échantillons de raisin on a injecté directement 500 μl de vapeur en équilibre après 6 h en sachets cachetés.

Activité lytique: L'activité protéolytique a été déterminée sur caséine selon AHEARN *et al.* (1968). L'activité lipolytique a été déterminée sur milieu synthétique solide additionné de Bacto-lipase réagent (Difco).

L'acide acétique a été déterminé enzymatiquement selon HOLZ et BERGMAYER (1974).

Résultats et discussion

Caractérisation des espèces des levures isolées de raisins infectés

Les isolements conduits pendant 2 ans (1981, 1982) et en localités diverses ont mis en évidence une remarquable hétérogénéité temporelle et micro-géographique des espèces de levures isolées.

Dans le Tableau 1 nous reportons la désignation taxonomique des espèces ainsi que la fréquence d'isolement pendant les 2 années dans les milieux divers sur 291 isolé-

Tableau 1

Désignation taxonomique et nombre des souches isolées sur des raisins pourris de localités diverses
Taxonomic designation and number of yeasts isolated on rotten grapes from different localities

	Année 1981				Année 1982		
	Tebano	Argelato	Tebano ¹⁾	Total des isolés	Argelato	Forli	Total des isolés
Echantillons pourris examinés	62	20	17		28	11	
Echantillons sans levures	0	0	0		0	0	
Echantillons avec bactéries	10	0	1		18	7	
Désignation taxonomique:							
<i>Candida steatolytica</i>	21	0	6	27	3	0	3
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	5	0	7	12	3	2	5
<i>Candida sorbosa</i>	5	10	0	15	6	5	11
<i>Candida</i> spp.	15	20	5	40	1	0	1
<i>Pichia membranaefaciens</i>	12	2	3	17	8	2	10
<i>Pichia</i> spp.	18	12	7	37	10	1	11
<i>Hanseniaspora</i> spp.	8	1	10	19	15	2	17
<i>Issatchenkia</i> sp.	4	0	0	4	6	2	8
<i>Endomycopsella crataegensis</i>	6	0	1	7	3	0	3
<i>Endomycopsella vini</i>	2	0	0	2	5	0	5
<i>Zygosaccharomyces</i> spp.	0	0	0	0	0	3	3
<i>Saccharomyces</i> spp.	1	10	4	15	0	0	0
<i>Saccharomyces ludwigii</i>	0	0	0	0	5	0	5
<i>Brettanomyces</i> spp.	2	0	1	3	1	0	1
Espèces non identifiées	2	1	2	5	2	3	5

¹⁾ Raisins surmûris.

ments. Nous reportons aussi la fréquence d'isolement des bactéries sans en préciser l'espèce.

Il faut signaler que le nombre de cellules de levure/ml de jus dans les raisins pourris est en moyenne de (1—5) · 10⁶/ml.

Les espèces les plus fréquentes étaient en 1981 *Candida steatolytica*, *Candida* spp., *Hanseniaspora* spp., *Pichia* spp. et en 1982 *Hanseniaspora* spp., *Pichia* spp., *C. sorbosa*.

Celles-ci ne correspondent pas aux levures plus fréquentes dans les raisins sains de la même localité et dans les vignobles en général (DAVENPORT 1976). Les questions qui se dégagent de ces résultats peuvent être formulés de la façon suivante:

Tableau 2

Influence de l'inoculation à la floraison sur l'apparition de l'infection à la vendange
 Influence of inoculation at flowering on the appearance of infection at harvest

Souche inoculée	% de plantes pourries sur celles inocuées	% de grappes infectées
MA1 (<i>Pichia membranaefaciens</i>)	43	37
B37 (<i>Candida krusei</i>)	27	20
10H (<i>Candida steatolytica</i>)	60	49
<i>Endomycopsella vini</i> + <i>Candida steatolytica</i> (57D + 10H)	80	62
Plantes inocuées pourries totales	57	42
Plantes non inocuées pourries totales	28	21

1 — Existe-t-il dans la maladie une spécificité de rôle, ou l'espèce est-elle sans influence?

2 — Les levures que nous trouvons au moment de l'isolement sont-elles directement liées au procès infectif, ou encore se multiplient-elles à la suite des modifications déterminées par d'autres organismes?

Pour répondre à ces deux questions nous avons suivi deux directions: les inoculations artificielles en champ et en laboratoire et la comparaison des produits volatils du métabolisme *in vitro* et *in vivo* des souches isolées.

Inoculations expérimentales en champ

Pour une démonstration directe du rôle joué par les levures comme agents primaires et secondaires de la pourriture acide nous avons inoculé artificiellement 96 plantes de raisins de table à la floraison. Les souches ont été choisies parmi celles qui ont été isolées en 1981 des raisins infectés. Les résultats des observations effectuées à la récolte figurent dans le Tableau 2.

L'inoculation avec les diverses souches a comporté, exception faite de *C. krusei*, une augmentation de l'incidence de la maladie particulièrement évidente dans la combinaison *Endomycopsella vini* plus *C. steatolytica*.

Les isolements effectués sur des échantillons pourris de plantes inocuées ont permis d'isoler de nouveau des individus appartenant aux espèces inocuées à la floraison et des individus de *C. sorbosa*, *Metschnikowia pulcherrima*, *E. crataegensis* et *Hanseniaspora* spp. présents en proportions diverses. Les divers cépages ont démontré une sensibilité différente envers l'infection; les cépages Delight et Perlette ont été attaqués le plus fréquemment; 8 sur 10 plantes le cépage Delight et 9 sur 10 plantes le cépage Perlette. Nous avons observé la même incidence d'infection sur les plantes de contrôle non inocuées. Par contre, Thompson Seedless et Sultanina Muscat se sont révélés être les plus sains.

Inoculations artificielles sur des grains détachés et stérilisés

Nous avons considéré quelques variables, telles que température (21 et 28 °C), humidité relative, présence d'activateurs de croissance et de micro-blessures sur la surface du grain.

Nous avons inoculé toutes les souches indiquées dans le Tableau 1, séparément ou en combinaison (deux à deux), sur 4 échantillons de raisin de table provenant de l'Afrique du Sud. Il n'est pas facile d'en interpréter les résultats, étant donné que dans quelques combinaisons les symptômes de la maladie se sont manifestés sur les baies d'un échantillon et non sur les autres. Les combinaisons les plus efficaces ont été *M. pulcherrima* plus *E. crataegensis*, suivies par *M. pulcherrima* plus *H. uvarum*, qui ont donné des résultats positifs sur tous les échantillons à 28 °C et à une humidité relative de 95 % même, bien que dans une plus faible proportion, sur des grains non lésés artificiellement.

Comparaison des métabolites volatiles

Au cours de la mise au point d'une méthode rapide et reproductible de classification des levures nous avons observé que les profils GLC des composants volatils de l'espace de tête, en équilibre avec le milieu de culture, peuvent constituer une «signature» de l'espèce examinée. La reproductibilité de cette méthode, qui ne sélectionne qu'un nombre limité des composants les plus importants, est très élevée si elle est effectuée dans des conditions de culture «standard» (travail en cours d'élaboration).

Nous avons appliqué cette méthode dans l'identification de levures responsables ou de toute façon associées à la pourriture acide. Nous avons mis en rapport les profils GLC de l'espace de tête des échantillons de grappes avec pourriture naturelle et des échantillons des grains artificiellement inoculés avec les profils de cultures sur moût de toutes les souches appartenant aux espèces indiquées dans le Tableau 1. Dans la figure nous montrons les modèles des profils des grappes saines et de celles qui sont atteintes du *B. cinerea* et de la pourriture acide. À l'aide de cette méthode nous avons examiné 30 échantillons de raisins malades des cépages Merlot, Sangiovese, Trebbiano provenant de localités diverses; nous avons toujours obtenu le même modèle GLC, bien différent de celui des grappes atteintes par *B. cinerea*. Du point de vue quantitatif nous avons observé dans tous les 30 échantillons des rapports constants dans les aires de divers pics. Particulièrement le rapport entre acétate d'éthyle et l'éthanol est en moyenne de 0,16 avec un σ/\bar{x} du 10,2 %. L'aire totale du profil est par contre directement proportionnelle au pourcentage de la surface infectée.

Parmi toutes les espèces que nous avons examinées deux seulement ont donné des profils GLC presque identiques à ceux des grappes atteintes par la pourriture acide

Tableau 3

Distribution d'activités lytiques extracellulaires dans les souches isolées sur des raisins pourris et sains

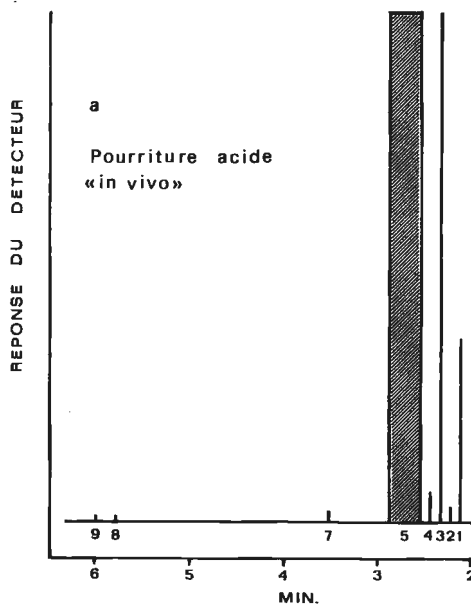
Distribution of extracellular lytic activities in the yeasts isolated on healthy and rotten grapes

	Nombre d'isolés	% d'activité pectolytique ¹⁾	% d'activité protéolytique ¹⁾	% d'activité lypolytique ¹⁾
Raisins pourris				
Année 1981	195	5	21	49
Année 1982	88	8	12	40
Raisins sains				
Année 1981	30	0	30	50

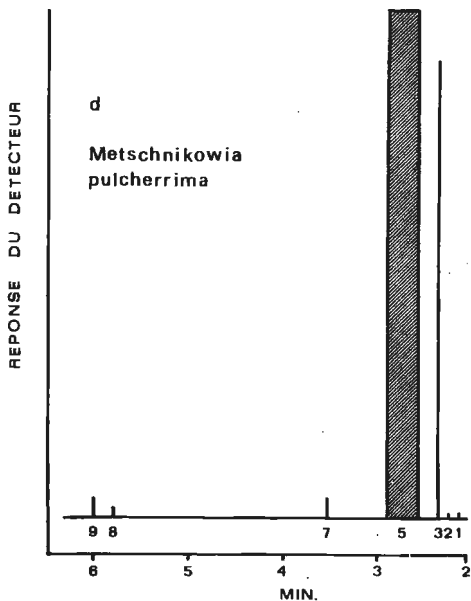
¹⁾ Pourcentage de souches dotées d'activité.

naturelle: *M. pulcherrima* et *H. uvarum*, cultivées sur moût ou inoculées séparément et en combinaison sur des grains stérilisés.

Les résultats peuvent suggérer que ces deux espèces jouent un rôle comme agents primaires ou secondaires de la pourriture. Cela peut sembler en contradiction avec les résultats des isollements qui n'indiquaient pas toujours ces espèces comme étant les plus fréquentes. D'autre part il faut considérer que dans les milieux «standard» des exigences spécifiques peuvent altérer l'évaluation des rapports quantitatifs.



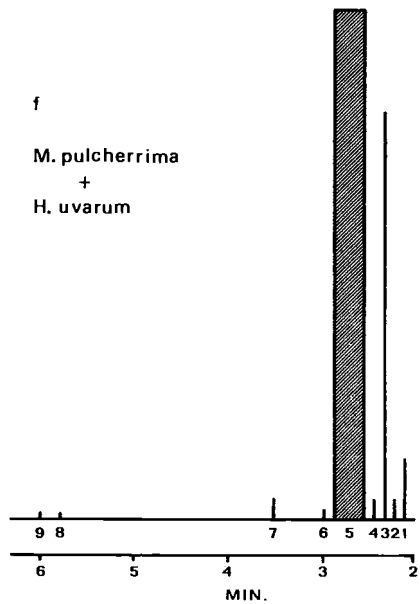
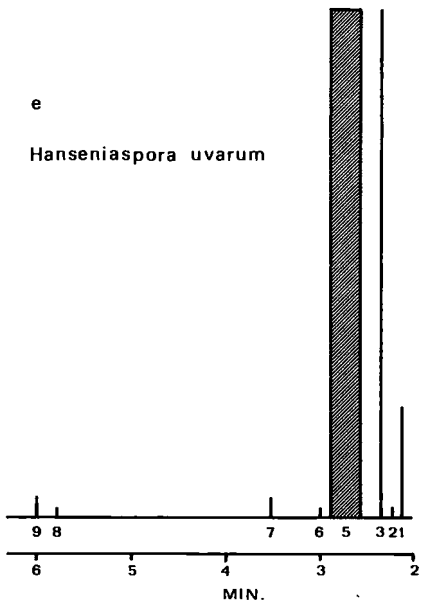
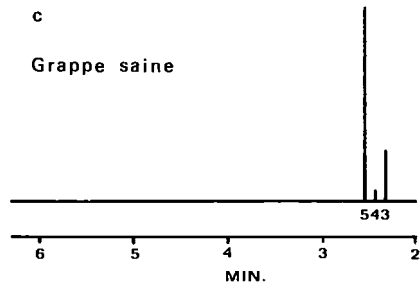
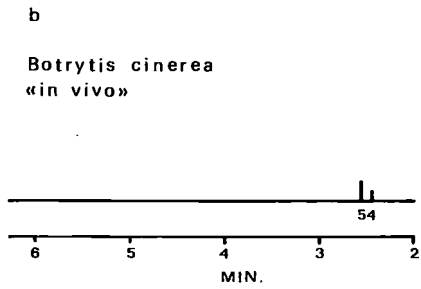
Modèles de profils GLC des composants volatils de l'espace de tête. — a, b, c: Espace de tête des grappes avec infection naturelle et des grappes saines; d, e: espace de tête des cultures des souches de *Metschnikowia pulcherrima* et *Hanseniaspora uvarum* dans le moût; f: espace de tête des grains infectés artificiellement avec *M. pulcherrima* + *H. uvarum*. — Pics: 1: Acétaldéhyde; 2: aldéhyde formique; 3: acétate d'éthyle; 4: non identifié; 5: éthanol; 6: n-propanol; 7: isobutanol; 8 et 9: alcools amyliques.



GLC profile patterns of headspace volatile compounds. — a, b, c: Head space volatile compounds of naturally infected and healthy grapes; d, e: of *Metschnikowia pulcherrima* and *Hanseniaspora uvarum* in must; f: of berries artificially inoculated with *M. pulcherrima* + *H. uvarum*. — Peaks: 1: Acetaldehyde; 2: formic aldehyde; 3: ethyl acetate; 4: not identified; 5: ethanol; 6: n-propanol; 7: isobutanol; 8 and 9: amylic alcohols.

Caractérisation physiologique des souches

L'identification de quelques espèces de levures comme étant probablement responsables des manifestations chimiques de la maladie ne nous permet pas d'en comprendre la dynamique, soit en ce qui concerne les mécanismes de pénétration dans les tissus, ou bien de la production importante d'acide acétique par les levures. En ce qui concerne le premier point, même en tenant compte du rôle probable des lésions de



nature diverse qui favorisent la pénétration des levures dans le grain, nous avons cherché à identifier si les souches plus fréquemment isolées dans les raisins infectés sont dotées d'un équipement enzymatique capable d'en favoriser la pénétration et le développement. Nous avons déterminé les activités protéolytiques, pectolytiques et lypolytiques extracellulaires, souvent associées à la virulence des agents phytopathogènes, soit dans les souches isolées des raisins pourris soit dans celles provenant de raisins sains du même micro-milieu.

Les éléments fournis par ces résultats, figurant dans le Tableau 3, peuvent être resumés comme suit:

- 1 — L'activité pectolytique extracellulaire est présente surtout dans une espèce, *E. vini*, souvent isolée dans des raisins atteints de pourriture acide et absente sur les raisins sains. L'activité dépolymérisante de ces enzymes, même en présentant des différences entre les souches, est du même niveau que celle des souches de *Saccharomyces fragilis*, notamment la levure ayant la plus grande activité. Selon la méthode employée, toutes les souches ont présenté une dépolymérisation moyenne de 60 %, exprimée en baisse de viscosité.
- 2 — L'activité protéolytique est présente en pourcentage plus élevé dans les souches isolées dans les raisins sains.
- 3 — L'activité lipolytique est indifféremment représentée dans les deux groupes d'isolées.

Production d'acide acétique

L'indicateur chimique de la pourriture est l'acide acétique, toujours accompagné d'acétate d'éthyle. Dans les levures cette production en quantité de 1 g/l est rare, même si elle a été plusieurs fois observée, pendant la vinification, à la suite de la présence d'espèces du genre *Hanseniaspora* et de son anamorphe *Kloeckera*.

Egalement *S. cerevisiae* dans des moûts très sucrés, ou par l'effet des modifications nutritives apportées aux moûts par le *B. cinerea*, peut en produire des quantités considérables (RIBÉREAU-GAYON 1982). Les levures du genre *Brettanomyces* sont caractérisées par une forte inhibition de la fermentation en conditions anaérobiques (effet Custers) avec une formation conséquente d'acide acétique de l'acétaldéhyde (SCHEFFERS et MISSET 1974, CARRASCOSA *et al.* 1981). Une autre condition à même d'induire dans les levures la production de cet acide est le pH près de la neutralité. Cette voie, appelée troisième voie de la fermentation, a été récemment considérée par YONG *et al.* (1980) à propos de *S. rouxii* dans la production de sauce du soja. La capacité de former esters et en particulier acétate d'éthyle a été signalée par YONG *et al.* (1981), toujours en *S. rouxii* à pH neutre et en *Hansenula anomala* en aérobiose et en semianaérobiose (DAVIES, FALKINER, WILKINSON et PEEL 1951, PEEL 1951, LAUREMA et ERKAMA 1968; cit. par YONG *et al.* 1981).

Dans le cas de la pourriture acide la quantité d'acide acétique présent dans les baies pourries varie de 0,3 à 12,4 g/l de jus (GUERZONI e MARCHETTI 1982). Toutes les souches appartenant à des espèces différentes isolées de raisins pourris et cultivées en conditions standard et sur moûts en produisent des quantités très semblables de 0,5 g/l. Seules les souches appartenant aux genres *Candida* et *Dekkera* peuvent en produire des quantités de 1 g/l.

Dans l'hypothèse que la production d'acide acétique peut être la conséquence d'une altération métabolique des levures, dérivant des conditions physiologiques particulières du fruit, nous avons cherché à évaluer l'influence de certains facteurs nutritifs ou même inhibiteurs sur le métabolisme des levures.

Tableau 4

Influence sur la production d'acide acétique des modifications apportées au moût par 5 espèces de levures isolées fréquemment sur les raisins infectés

Influence of must modifications on the acetic acid production by 5 yeast species more frequently isolated on rotten grapes

Conditions	Production d'acide acétique (g/l)		
	Moyenne	Minimum	Maximum
Moût témoin ¹⁾	0,34	0,06	1,13
Moût à pH 6 ²⁾	1,74	0,84	3,60
Moût + 50 ppm de vinchlozoline	0,30	0,17	0,53
Moût botrytisé ³⁾	0,69	0,15	3,00
Moût additionné de:			
Glucose 10 %	0,37	0,17	0,64
Glucose 20 %	0,39	0,13	0,87
Fructose 10 %	0,51	0,26	1,00
Fructose 20 %	0,37	0,21	0,67
K ⁺ 0,25 %	0,31	0,12	0,48
K ⁺ 0,5 %	0,33	0,18	0,57
K ⁺ 0,75 %	0,28	0,18	0,54
K ⁺ 1,5 %	0,53	0,24	0,75
K ⁺ 2,5 %	0,56	0,13	0,99
K ⁺ 5 %	0,57	0,30	0,84
K ⁺ 10 %	0,51	0,22	0,93

¹⁾ Moût Trebbiano avec 15 % en sucres, pH 3,3.

²⁾ pH modifié avec NaOH.

³⁾ Moût inoculé avec *Botrytis cinerea*, filtré stérilement après 15 d et inoculé de nouveau avec les 5 souches.

Dans le Tableau 4 nous reportons les valeurs moyennes obtenues sur 5 souches appartenant aux espèces choisies parmi les plus fréquentes.

La condition qui, dans toutes les souches, augmente davantage la production est le pH neutre. Un développement précédent dans le même moût de *B. cinerea* et une concentration élevée de sucre peuvent aussi augmenter l'acide acétique. Même si le pH du moût est d'environ 3—3,3 nous ne pouvons pas exclure que des conditions physiologiques particulières puissent altérer le pH de quelques micro-milieus du grain.

Conclusions

La pourriture acide est une manifestation atypique, par rapport aux autres affections de la vigne et, plus en général, des fruits. On peut y associer, en effet, des levures, organismes rarement considérés des agents phytopathogènes primaires; la «signature» de la maladie est spécifiquement chimique: présence d'acide acétique et d'acétate

d'éthyle, enfin la cinétique de la manifestation est explosive et peu dépendante des conditions climatiques, même si des lésions dues à des influences météorologiques peuvent la favoriser.

L'élément le plus important de cette atypicité est le manque d'une stricte spécificité de l'agent étiologique. Nous avons essayé d'affronter ce problème, éminemment phytopathologique, outre par les techniques les plus usuelles d'isolement et d'identification, par l'application de l'analyse GLC de l'espace de tête des composants volatils. Cette approche, en conformité avec les résultats obtenus par analyses traditionnelles (GUERZONI et MARCHETTI 1982), nous a amené à établir que le modèle chimique de la maladie est constant et reproductible *in vitro* de la part de quelques espèces telles que *M. pulcherrima* et *H. uvarum*, seules ou en association.

Un autre élément d'intérêt est la fréquence élevée d'activités pectolytiques extracellulaires dans les souches isolées de raisins pourris et appartenant aux espèces *E. crataegensis* et *E. vini*. Ces espèces, incapables de produire les métabolites volatils caractérisant la maladie, pourraient toutefois favoriser la pénétration dans les tissus d'autres espèces.

Le problème le plus grave dérivant de l'infection est la présence d'acide acétique qu'on ne peut plus éliminer en cave. Nous ne sommes pas encore en mesure de donner une explication d'une production si élevée par les levures.

Du reste la connaissance incomplète des événements qui se succèdent au cours de la maladie rend difficile, même *in vitro*, de simuler des conditions chimico-physiques et nutritionnelles capables d'induire dans les levures ce qui probablement doit être considéré comme un dismétabolisme.

Résumé

Les espèces et la fréquence d'isolement des levures associées à la pourriture acide ont été déterminées.

Les genres les plus fréquemment isolés ont été *Candida*, *Pichia* et *Hanseniaspora*, qui sont à même de reproduire *in vivo* les symptômes de la maladie. Néanmoins d'autres espèces, bien que moins fréquentes, se sont révélées être capables de provoquer la pourriture acide *in vitro* et de reproduire des profils GLC des composants volatils de l'espace de tête très semblables à ceux des grappes infectées naturellement.

Les activités enzymatiques extracellulaires lytiques et leur fréquence dans la population des levures isolées sur les raisins pourris ont été étudiées.

Bibliographie

1. AHEHARN, D., MEYERS, S. P. and NICHOLS, R. A., 1968: Extracellular proteinases of yeast and yeast-like fungi. *Appl. Microbiol.* **16**, 1370—1374.
2. BARNETT, J. A., PAYNE, R. W. and YARROW, D., 1979: A guide for identifying and classifying yeasts. Cambridge University Press.
3. BISIACH, M., MINERVINI, G. e SALOMONE, M. C., 1981: Ricerche sperimentali sul marciume acido del grappolo e sui suoi rapporti con la muffa grigia. *Not. Mal. Pianta* **102**, 61—79.
4. — — — — e — — — —, 1982: Recherches expérimentales sur la pourriture acide de la grappe et sur ses rapports avec la pourriture grise. *Bull. OEPP* **12**, 5—28.
5. CARRASCOSA, J. M., VIGUERA, N. D., CASTRO, N. and SCHEFFERS, W. A., 1981: Metabolism of acetaldehyde and Custers effect in the yeast *Brettanomyces abstinentis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **47**, 209—215.

6. DAVENPORT, R. R., 1976: Distribution of yeasts and yeast-like organisms from aerial surfaces of developing apples and grapes. In: DICKINSON, C. M. and PREECE, T. F. (Eds.): Microbiology of aerial plant surfaces, 325—359. Academic Press, New York.
7. GUERZONI, M. E., INTRIERI, C., MARCHETTI, R. et GIUDICI, P., 1982: Contribution à la connaissance d'une nouvelle maladie de la grappe: la pourriture acide. Symp. Intern. Raisin de Table et Raisin Sec, 5—11 september 1982, Héraklion (Grèce), 469—478.
8. — — —, e MARCHETTI, R., 1982: Microflora associata al marciume acido della vite e modificazioni indotte dalla malattia sulla composizione delle uve e dei mosti. Difesa Piante 4, 231—246.
9. HOLZ, R. E. and BERGMAYER, H. U., 1974: Acetate determination with acetate kinase and hydroxylamine. In: BERGMAYER, H. U. (Ed.): Methods of enzymatic analysis, 1528. Academic Press, New York.
10. MARTINI, A., FEDERICI, F., and ROSINI, G., 1980: A new approach to the study of yeast ecology of natural substrates. Canad. J. Microbiol. 26, 856—860.
11. MORANDO, A., NEBIOLO, P., BOSTICARDO, V. e GRASSO, C., 1983: Prove di lotta contro il «Marciume acido» del grappolo. Vignevini 6, 51—55.
12. RIBÉREAU-GAYON, P., 1982: Incidences oenologiques de la pourriture de raisin. Bull. OEPP 12 (2), 201—214.
13. SCHEFFERS, W. A. and MISSET, O., 1974: The Custers effect in *Brettanomyces intermedius*. Proc. 4th Intern. Symp. Yeasts, Vienna (Austria), Part I, 39—40.
14. YONG, F. M., LEE, K. H., WONG, H. A., 1980: The production of volatile acids from glucose by soy yeasts (*Saccharomyces rouxii*) NRRL Y-1096. J. Food Technol. 15, 421—428.
15. — — —, — — — and — — —, 1981: The production of ethyl acetate by soy yeast *Saccharomyces rouxii* NRRL Y-1096. J. Food Technol. 16, 177—184.

Eingegangen am 18. 8. 1983

Prof. M. ELISABETTA GUERZONI
Dipartimento di Protezione
e Valorizzazione Agroalimentare
Sezione Microbiologia
Università di Bologna
Via S. Giacomo 7
40126 Bologna
Italia