IVES Technical Reviews
rebe & wein

https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2020.4544

Brettanomyces bruxellensis Biofilme: ein Lebensstil, um stressigen Umweltbedingungen zu widerstehen?

Basiert auf dem wissenschaftlichen Artikel "New advances on the *Brettanomyces bruxellensis* biofilm mode of life" (International Journal of Food Microbiology 2020)[1].

>>> Die Bildung von Biofilmen ist eine potenzielle Resistenzstrategie von Mikroorganismen, die jedoch für *Brettanomyces bruxellensis*, eine im Wein unerwünschte Schadhefe, bisher wenig erforscht wurde. In diesem Zusammenhang wurden zwei Stämme hinsichtlich ihrer Fähigkeit sich in Wein an Edelstahlchips zu haften und Biofilme zu bilden, untersucht. Mithilfe der Elektronenmikroskopie wurden spezifische Zellstrukturen wie filamentöse Zellen oder Chlamydosporen-ähnliche Strukturen identifiziert, die möglicherweise an der Ausbildung von Resistenzen bei *B. bruxellensis* beteiligt sind. Darüber hinaus sind die aus Biofilmen freigesetzten Zellen vermutlich der Ursprung wiederkehrender Verderbnisfälle in Weinen. <<<

Ein Biofilm ist eine Gemeinschaft von Mikroorganismen, die irreversibel an eine Oberfläche gebunden und in eine selbst produzierte Matrix eingebettet sind, wodurch sie zusammengehalten werden. Diese weit verbreitete Wachstumsstrategie fördert die Besiedlung von Oberflächen sowie die Beständigkeit in verschiedenen Umgebungen, und trägt auch zu einer erhöhten Stressresistenz bei[2]. Die Fähigkeit von *Brettanomyces bruxellensis*, der bedeutendsten Schadhefe in Weinen, Biofilme zu bilden, ist in der Literatur nur unzureichend beschrieben. Der Nachweis, dass *B. bruxellensis* in der Lage ist, auf Oberflächen von Weinherstellungsgeräten zu haften und Biofilme zu bilden, würde die Entwicklung geeigneter Strategien für dessen effiziente Entfernung ermöglichen. In diesem Zusammenhang waren die Ziele dieser Studie: erstens, nachzuweisen dass *B. bruxellensis* tatsächlich in der Lage ist, Biofilme zu bilden; zweitens, die verschiedenen Zellstrukturen innerhalb dieser Biofilme unter Verwendung der Mikroskopie zu beschreiben; und drittens, den Einfluss von Wein auf bestehende Biofilme, die von zwei *B. bruxellensis*-Stämmen produziert wurden, zu untersuchen.

■ Biofilmbildung und -struktur in Wein

Die Zellen zweier ausgewählter Stämme (mit "11" und "14" bezeichnet und zuvor aus Weinherstellungsgeräten isoliert) wurden zunächst, wie von Longin *et al.*, 2016[3] beschrieben, an die typischen in Rotweinen herrschenden Bedingungen (Alkoholkonzentration und pH) angepasst. Darüber hinaus stellten Starterkulturen sicher, dass sich die Zellen vor der Biofilmbildung im gleichen physiologischen Stadium befanden, welches dem Ende der exponentiellen Wachstumsphase entsprach. Dies gewährleistete einen genaueren Vergleich beider Stämme. Die Biofilmbildung von *B. bruxellensis* in Wein wurde auf Edelstahlchips durch Anpassung eines etablierten Protokolls untersucht[4]:

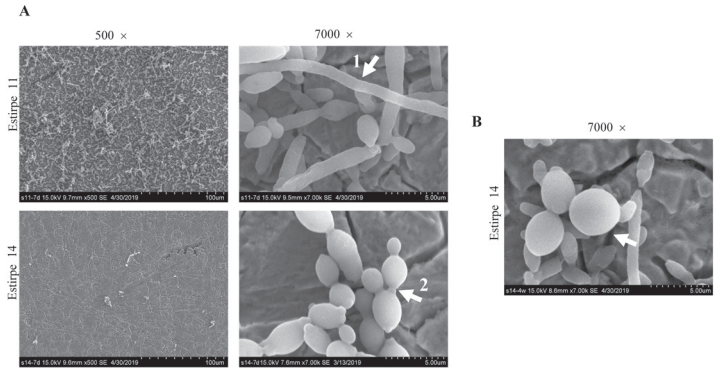


Abbildung 1. REM-Aufnahmen von 7 Tage alten Mikrokolonien der Stämme 11 und 14, die in Rotwein auf Edelstahlchips inkubiert wurden. Vergrößerungen: 500 x (Entwicklung der Mikrokolonien auf der Edelstahloberfläche) und 7000 x (filamentöse Zellen und EPS sind mit den weißen Pfeilen No1 bzw. No2 gekennzeichnet). B) REM-Aufnahme von 14 Tage alten Mikrokolonien des Stammes 14, die in Rotwein auf Edelstahlchips inkubiert wurden. Die Vergrößerung ist 7000 x (eine Chlamydosporen-ähnliche Struktur ist mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet).

Edelstahlchips (25 × 25 mm) wurden in 15 ml Rotwein getaucht, der mit 5,0 × 105 KBE/mL Zellen beimpft worden war. Nach 7- bzw. 14-tägiger Inkubation bei 28 °C wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung abgelöst. Die Anzahl kultivierbarer Zellen wurde durch Ausplattierung auf YPD-Medium bestimmt, und die Biofilmstruktur mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie (SEM) untersucht.
Die Adhäsion und Biofilmbildung beider Stämme auf dem Chip in Wein wurden nach 2 h und 24 h, und nach 7 und 14 Tagen Inkubation unter Verwendung des eben beschriebenen Protokolls untersucht. Die Hefekulturen wurden anfänglich mit etwa 106 KBE/mL beimpft (Tabelle 1). Die Adhäsionsrate von Stamm 14 (0,69 %) war im Vergleich zu Stamm 11 (5,69 %) relativ niedrig. Dieser Unterschied blieb während der ersten 7 Tage bestehen. Dies änderte sich jedoch nach 14 Tagen Inkubationszeit, obwohl für beide Stämme im Wein kein zusätzliches Biofilmwachstum beobachtet wurde (Tabelle 1). Dies zeigt, dass sich *B. bruxellensis* unter rauen Bedingungen, wie sie im Wein zu finden sind, an Oberflächen anhaften und Biofilme bilden kann. Das Biofilmwachstum ist jedoch nach 14 Tagen Inkubationszeit relativ schwach.
Parallel dazu wurden für die beiden Stämme 11 und 14, nach 7-tägiger Inkubation auf Edelstahlchips, Mikrokolonien beobachtet, die in extrazelluläre

Tabelle 1. Mikrokoloniewachstum der Stämme 11 und 14 in Wein auf Edelstahlchips nach 2 bzw. 24 Stunden, und nach 7 bzw. 14 Tagen. Die Werte stellen den Durchschnitt von drei unabhängigen biologischen Replikaten mit Standardabweichungen (Werte in grau) dar. Das Zeichen * zeigt einen signifikanten Unterschied (ANOVA, p-Wert ≤ 0,05) zwischen den beiden Stämmen für einen bestimmten Zeitpunkt an.

Stamm	Anfangspopulation in Wein KBE/mL	Population auf dem Chip (KBE/cm²)			
	0 Stunde	2 Stunden*	24 Stunden*	7 Tage*	14 Tage
11	$5.44 \times 10^5 \pm 2.59 \times 10^5$	$3.22 \times 10^4 \pm 8.75 \times 10^3$	$5.26 \times 10^4 \pm 8.55 \times 10^3$	$1.06 \times 10^5 \pm 5.53 \times 10^4$	$1.79 \times 10^4 \pm 5.37 \times 10^3$
14	$1.33 \times 10^6 \pm 4.67 \times 10^5$	$9.53 \times 10^3 \pm 7.04 \times 10^3$	$1.50 \times 10^4 \pm 9.05 \times 10^3$	$4.78 \times 10^3 \pm 6.11 \times 10^3$	$5.29 \times 10^3 \pm 7.15 \times 10^3$

LabEx COTE unterstützt die Gründung und Einrichtung der IVES Technical Reviews im Rahmen seines Aufrufs zur Einreichung von Projekten mit dem Ziel von Transfer und Valorisierung.

polymere Substanzen (EPS) eingebettete Zellen enthielten (Abbildung 1A). Diese Mikrokolonien bestanden zudem aus zahlreichen filamentösen Zellen, die vermutlich eine strukturelle Rolle im Biofilm spielen (Abbildung 1A). Weiterhin zeigten mikroskopische Untersuchungen auch das Vorhandensein von Strukturen, die größer als die übliche Hefezelle waren, mit dicken Zellwänden, die sich von filamentöse Zellen ableiteten (Abbildung 1B). Diese Eigenschaften sind charakteristisch für Chlamydosporen-ähnliche Strukturen, wie zuvor für *C. albicans* beschrieben wurden[5].

■ Der Einfluss von Wein auf den Biofilm von *B. bruxellensis*

Die Biofilme wurden zunächst auf Edelstahlchips in YPD-Medium produziert (wie zuvor beschrieben). Nach 7-tägiger Inkubation wurden die Chips mit den in Biofilmen befindlichen Zellen in Wein übertragen. Dies erlaubte, den Einfluss des Weines auf einen 7 Tage alten *B. bruxellensis* Biofilm zu untersuchen. Zwei verschiedene Zelltypen wurden gezählt: (i) diejenigen, die im Biofilm verblieben sind, und (ii) diejenigen, die in den Wein freigesetzt wurden (Abbildung 2). Für beide Stämme nahm die Menge an Zellen innerhalb der Biofilme nach 24 h signifikant ab, blieb danach jedoch bis zu 14 Tage stabil (Abbildung 2A und 2B). Wie zuvor beschrieben, hatte der Wein einen stärkeren negativen Effekt auf Stamm 14 im Vergleich zu Stamm 11.

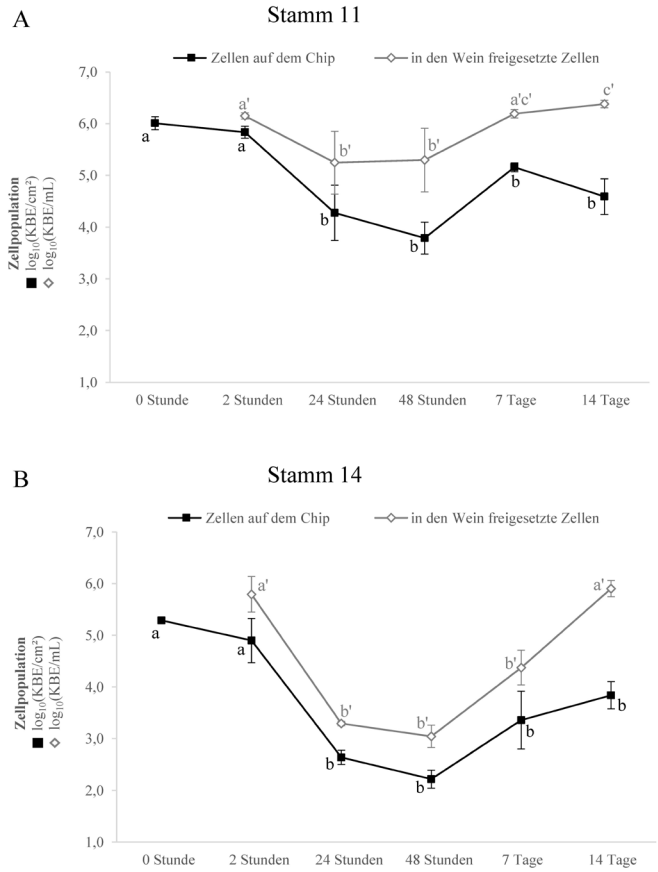


Abbildung 2. Mikrokolonieverhalten in Wein für (A) Stamm 11 und (B) Stamm 14. Die Zellpopulation auf dem Chip ist in log10(KBE/cm²) und die in den Wein freigesetzte Zellpopulation ist in log10(KBE/ml) dargestellt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung zwischen drei unabhängigen Replikaten. Verschiedene Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (ANOVA, p-Wert ≤ 0,05).

Eine beträchtliche Menge an Zellen wurde aus den Biofilmen beider Stämme schon 2 h (ca.106 KBE/ml) nach der Übertragung in Wein registriert (Abbildung 2A und 2B). Für Stamm 14 wurde in den darauffolgenden 24 h eine Abnahme der Anzahl freigesetzter Zellen beobachtet, die dann bis zu 7 Tage stabil blieben. Danach folgte ein erneuter Anstieg zwischen den Tagen 7 und 14. Das gleiche Verhalten wurde in einem geringeren Maß für Stamm 11 beobachtet.

■ Fazit

In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Schadhefe *B. bruxellensis* in Wein in der Lage ist, Biofilme auf Edelstahloberflächen zu bilden. Wie für andere Mikroorganismen beschrieben[6], ermöglicht der Biofilm-Lebensstil *B. bruxellensis*, in Wein und unter weinähnlichen Bedingungen zu überdauern und ist zudem ein wichtiger Faktor, der zur Kontamination von Weinen beiträgt. Dies sollte bei der Reinigung von Tanks oder Rohren berücksichtigt werden. Der Reinigungsprozess ist nach der Bildung eines Biofilms möglicherweise weniger effektiv, da ein Biofilm Zellen bessere Überlebenschancen unter stressigen Umweltbedingungen bietet. Darüber hinaus zeigten REM-Aufnahmen „Chlamydosporen-ähnliche" Strukturen, die bisher für *B. bruxellensis* noch nicht beschrieben wurden. Chlamydosporen wurden bei einigen Pilzen als Resistenzformen beschrieben[7], bei Hefen ist ihre Rolle jedoch unklar. Zukünftige Studien sollten sich auf die tatsächlichen Funktionen dieser „Chlamydosporen-ähnlichen" Strukturen in *B. bruxellensis* konzentrieren, sowie deren Rolle in der Überdauerung dieser Schadhefe in Weinkellern. ■

Sandrine Rousseaux, Manon Lebleux, Hany Abdo, Louise Basmacyian, Chloé Roullier-Gall, Hervé Alexandre, Stéphanie Weidmann
UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Equipe VAlMiS (Vin, Aliments, Microbiologie, Stress), AgroSup Dijon - Université Bourgogne Franche-Comté, IUVV, Dijon, France

1 Lebleux, M., Abdo, H., Coelho, C., Basmaciyan, L., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Roullier-Gall., Alexandre, H. Guilloux-Benatier, M., Weidmann, & S. Rousseaux, S. (2020). "New Advances on the *Brettanomyces bruxellensis* Biofilm Mode of Life." *International Journal of Food Microbiology*, vol. 318, p. 108464., doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108464.
2 Davey, M.E., & O'toole, GA. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 64, p. 847-867.
3 Longin, C., Degueurce, C., Julliat, F., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., & Alexandre, H. (2016). Efficiency of population-dependent sulfite against *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. *Food Res Int*, vol. 89, p. 620-630.
4 Bastard, A., Coelho, C., Briandet, R., Canette, A., Gougeon, R., Alexandre, H., Guzzo, J., & Weidmann, S. (2016). Effect of biofilm formation by Oenococcus oeni on malolactic fermentation and the release of aromatic compounds in wine. *Front Microbiol*, vol. 7, p. 613.
5 Martin, S.W., Douglas, L.M., & Konopka, J.B. (2005). Cell cycle dynamics and quorum sensing in Candida albicans chlamydospores are distinct from budding and hyphal growth. *Eukaryot Cell*, vol. 4, p. 1191-202.
6 Davey, M.E., & O'toole, GA. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 64, p. 847-867.
7 Ojeda-Robertos NF, Torres-Acosta JF, Ayala-Burgos AJ, Sandoval-Castro CA, Valero-Coss RO, Mendoza-de-Gives P. 2009. Digestibility of Duddingtonia flagrans chlamydospores in ruminants: in vitro and in vivo studies. *BMC Vet Res* 5:46.