IVES Technical Reviews
rebe & wein

https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2021.4554

Welche Hygienemaßnahmen sollten angewandt werden, um *Brettanomyces bruxellensis* Biofilme zu entfernen?

>>> In diesem Artikel beschreiben wir fünf *Brettanomyces bruxellensis* Stämme, die in der Lage sind, Biofilme auf rostfreiem Stahl zu bilden. Die Entfernung dieser Biofilme wurde unter Verwendung einer Milchsäurelösung und einer Referenzmethode (einer Lösung aus schäumendem Ätznatron und 5 % Peroxid) durchgeführt. In Abhängigkeit vom jeweiligen Stamm wurden unterschiedliche Reaktionen beobachtet: die Behandlung mit Milchsäurelösung führte zu einer leicht verringerten Zellpopulation. Die Referenzmethode hingegen entfernte anhaftende Zellen bei drei Stämmen komplett, und führte bei zwei anderen zu einem VBNC-Stadium (viable but not culturable: lebensfähig, aber nicht kultivierbar). Wie genau sich eine bestimmte Reinigungsmethode auf einen Biofilm auswirkt, ist somit abhängig vom Hefestamm. <<<

Hygienemaßnahmen stehen im Mittelpunkt von Richtlinien zur Bekämpfung mikrobieller Kontaminationen auf Weingütern, und insbesondere der Kontamination mit *Brettanomyces bruxellensis*. Diese Hefe kann sehr gut unter stressigen Bedingungen überleben, wie zum Beispiel in Gegenwart von Sulfiten[1, 2, 3]. Die Biofilmbildung ist dabei eine mögliche Resistenzstrategie, die von einigen Hefen genutzt wird[4], obwohl *B. bruxellensis* dahingehend bisher eher wenig Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Biofilme stellen eine Gemeinschaft von einer oder mehrerer Arten von Mikroorganismen dar, die an biotischen und abiotischen Oberflächen haften. Sie können dreidimensional wachsen und sind in eine Matrix selbst produzierter EPS (*Extra Polymeric Substances*)[5] eingebettet. Eine kürzlich am IUVV (Dijon, Frankreich) durchgeführte Studie beschrieb den Biofilm von *B. bruxellensis* als eine dünne Struktur, bestehend aus verschiedenen Zellmorphologien, einschließlich Hefezellen und pseudofilamentösen Zellen, die in eine extrazelluläre Matrix eingebettet sind (Abbildung 1)[6]. Darüber hinaus wurde die Beständigkeit von Biofilmzellen auf Oberflächen im Zeitverlauf gezeigt.

Das zurzeit am häufigsten angewandte Verfahren zur Reinigung von Tanks besteht darin, eine Mischung verdünnter chemischer Lösungen aufzutragen, die aus alkalische Reinigungsmittel und sauren Lösungen besteht[7]. Umweltfreundlichere Alternativen, die bei der Bekämpfung aller Überlebensformen von *B. bruxellensis* wirksam sind, werden dennoch gesucht, um den Einsatz von Chemikalien in der Weinindustrie zu reduzieren. Aus diesem Grund haben wir zwei verschiedene Reinigungsmethoden (eine Lösung aus schäumender Natronlauge und 5 % Peroxid, und eine 5 %-ige Milchsäurelösung) hinsichtlich ihrer Wirksamkeit gegenüber verschiedenen *Brettanomyces*-Stämmen in Biofilmen untersucht.

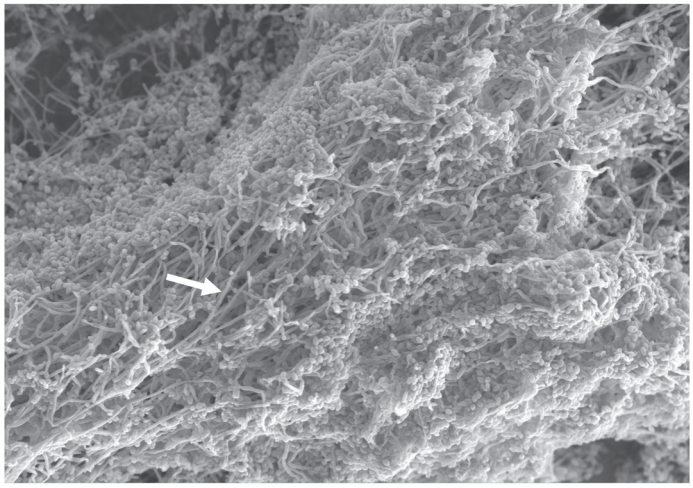


Abbildung 1. Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahme (500x) eines einen Monat alten *Brettanomyces bruxellensis* Biofilms, der sich auf einem Edelstahlchip in YPD-Medium entwickelte. Die Oberfläche ist mit Mikrokolonien bedeckt, die Hefe- und filamentöse Zellen enthalten (angezeigt durch einen weißen Pfeil).

■ Lösungen für die Entfernung von *Brettanomyces bruxellensis* Biofilmen

Fünf *B. bruxellensis* Stämme unterschiedlicher Herkunft wurden verwendet (Tabelle 1) und zwei verschiedene Reinigungsmethoden sollten getestet werden. Dafür wurden vierzehn Tage alte Biofilme verwendet, die auf Edelstahlchips in einem Labor-üblichen synthetischen Medium kultiviert wurden (Yeast-Peptone-Dextrose (YPD), Hefeextrakt-Pepton-Dextrose Medium).
Die Verwendung von Starterkulturen stellte sicher, dass sich vor der Biofilmanimpfung alle Zellen in demselben physiologischen Stadium befanden. Dies ermöglichte einen genaueren Vergleich hinsichtlich der Biofilmbildung verschiedener Stämme. Die Wachstumskinetik war wie erwartet vom Stamm abhängig, wobei BR17 im Vergleich zu den anderen Stämmen am langsamsten wuchs und GS04 am schnellsten (Tabelle 1). Die Fähigkeit aller untersuchter Stämme, sich an die Oberfläche von Edelstahlchips

Tabelle 1. Herkunft und Wachstumsparameter von *B. bruxellensis*-Stämmen.

Stamm	Herkunft	Latenzphase (h)	Generationszeit (h)	Wachstumsrate μ (h^{-1})
S11	Wein aus Burgund (IUVV, Dijon)	40 ±8,021	11,36 ±4,867	0,097 ±0,042
S14	Wein aus Burgund (IUVV, Dijon)	27 ±1,732	18,47 ±4,265	0,056 ±0,013
BR17	Wein aus dem Rhonetal (IR, Orange)	100 ±0,000	29,76 ±4,066	0,034 ±0,005
GS04	Wein aus dem Rhonetal (IR, Orange)	27 ±0,000	12,15 ±0,156	0,08 ±0,001
GS12	Wein aus dem Rhonetal (IR, Orange)	29 ±0,000	22,67 ±1,365	0,044 ±0,003

Latenzphase: Zeitraum vor dem schnellen Wachstum, währenddessen sich die Zellzahl nicht verändert.
Generationszeit: die Zeit die ein Mikroorganismus benötigt, um seine Zellzahl zu verdoppeln.
Wachstumsrate: Betrag, um den sich eine Variable über einen bestimmten Zeitraum erhöht.

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.

anzuhaften und einen Biofilm zu bilden, wurde mit einer Ausgangspopulation von etwa 106 Zellen/ cm² für alle Stämme nach 14 Tagen Inkubation bestätigt (Abbildung 2).

. Die Weingutmethode

Die Weingutmethode ist eine Referenzmethode des Inter Rhône Kellers. Sie besteht darin, eine Lösung aus schäumender Natronlauge und 5 % Peroxid auf zu desinfizierende Flächen aufzutragen. Biofilme wurden 15 Minuten lang dieser Lösung ausgesetzt. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen, die sich noch auf der Oberfläche des Chips befanden, mithilfe von Agarmedien (kultivierbare Population) und Durchflusszytometrie (lebensfähige Population) bestimmt. Für die drei Stämme S11, GS04 und GS12 wurden keine verbleibenden Zellen auf den Chips nachgewiesen, was die Wirksamkeit dieses Verfahrens demonstriert (Abbildung 2A). Für die Stämme BR17 und S14 wurden jedoch einige lebensfähige Zellen mithilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen. Diese Zellen waren in einem lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren (VBNC) Stadium[3].

. Die Milchsäuremethode

Um die Benutzung alternativer Reinigungsverfahren für Weinbereitungsanlagen zu untersuchen, wurde der folgende umweltfreundlichere Ansatz getestet: Biofilme wurden 15 Minuten lang mit 5 %-iger Milchsäure behandelt. Danach wurden die sich auf den Edelstahlchips befindlichen Zellpopulationen, wie zuvor beschrieben, analysiert. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Verringerung in der Population kultivierbarer Zellen auf den Chips für alle Stämme, mit Ausnahme von GS12 (Abbildung 2B). Die Behandlung eliminierte allerdings nicht alle Zellen.

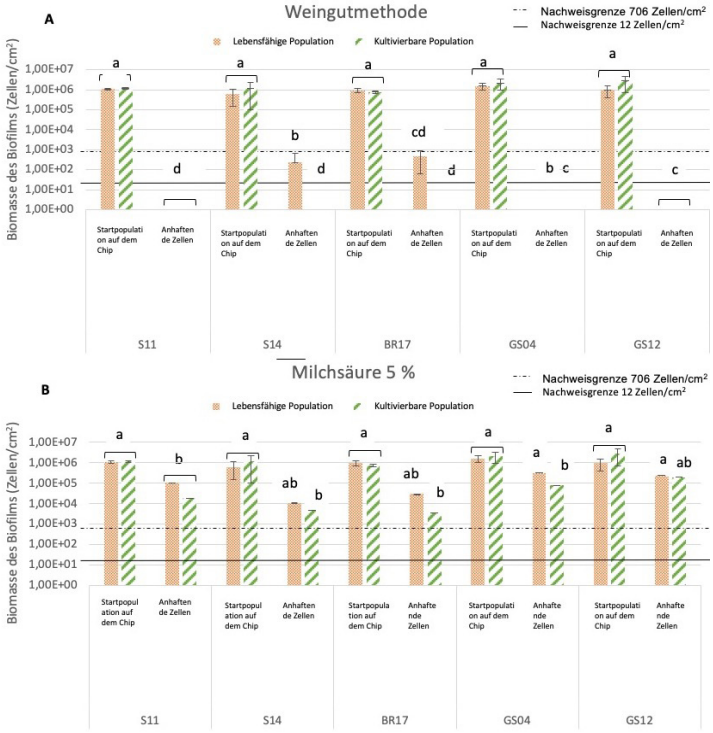


Abbildung 2. Vergleich der Konzentrationen lebensfähiger oder kultivierbarer Zellpopulationen (Zellen/ cm²) von fünf *B. bruxellensis*-Stämmen nach Anwendung der sogenannten Weingutmethode (A) und nach der Benutzung einer 5 %-igen Milchsäurelösung (B). Der Begriff "anhaftende Zellen" entspricht den Zellen, die nach der Behandlung noch an die Oberfläche des Chips gebunden waren. Signifikanten Unterschiede (p-Werte ≤ 0,05) zwischen den angehaftenden Zellpopulation sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet. Nachweisgrenze: 706 Zellen/ cm² (Zytometer: lebensfähig; gepunktete Linie), 12 Zellen/ cm² (Platte: kultivierbar; volle Linie).

Diese Experimente verdeutlichen jedoch Stamm- und Behandlungsabhängige Unterschiede. Der Stamm GS12 z. B. zeigte gegenüber der Milchsäuremethode eine etwas höhere Toleranz im Vergleich zu anderen Stämmen. Dahingegen gingen die Stämme BR17 und S14 nach der Anwendung der Weingutmethode in einen VBNC-Zustand über und sicherten somit ihr Überleben. Die Populationen der anderen drei Stämme sind allerdings vollständig eliminiert worden. Der VBNC-Zustand könnte eine Erklärung für die Widerstandsfähigkeit dieser beiden Stämme gegenüber unterschiedlichen chemischen Produkten erklären und die Ursache für die jährliche Kontamination der Tanks sein. Der VBNC-Zustand erlaubt Zellen, Stressbedingungen zu überdauern und ihr Wachstum wieder aufzunehmen, sobald sich die Voraussetzungen verbessern.

■ Fazit

Alle getesteten Stämme, unabhängig von ihrer Herkunft, waren in der Lage nach einer 14-tägigen Inkubation in einem YPD-Medium, auf Edelstahl Biofilme zu bilden (etwa 106 Zellen/ cm²). Gegenwärtig ist es durch die Behandlung mit Milchsäurelösung nicht möglich, *B. bruxellensis* vollständig zu entfernen. Es ist jedoch ein vielversprechender Ansatz, der, z. B. durch eine Erhöhung der Kontaktzeit oder der Konzentration der Lösung, verbessert werden kann. Die Weingutmethode zeigte eine hohe Wirksamkeit, wobei sich allerdings Zellen zweier Stämme nach der Behandlung im VBNC-Stadium befanden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Hygienemaßnahmen, wie auch SO_2[2, 3, 4], Stress für die Hefe darstellen auf welchen sie stammabhängigen reagiert. Die Entwicklung kostengünstiger, zuverlässiger Nachweismethoden, die auf Stammniveau reproduzierbar sind, könnten Möglichkeiten zur Vorhersage und Kontrolle von *B. bruxellensis* Kontamination bieten. ■

Manon Deluchat[1], Claire Lhomme[1], Claudine Degueurce[1], Virginie Serpaggi[1], Romain Lacroix[2], Manon Lebleux[3], Stéphanie Weidmann[3], Sandrine Rousseaux[3]
1 InterRhône, Service technique, 2260 route de grès, 84100 Orange, France
2 Syndicat des vignerons des Côtes du Rhône, Service technique, 2260 Route de grès, 84100 Orange, France
3 UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Equipe VAlMiS (Vin, Aliments, Microbiologie, Stress), AgroSup Dijon - Université Bourgogne Franche-Comté, IUVV, Dijon, France

1 Avramova, M., Vallet-Courbin, A., Maupeu, J., Masneuf-Pomarède, I., Albertin, W., (2018). Molecular diagnosis of *Brettanomyces bruxellensis*' sulfur dioxide sensitivity through genotype specific method. *Frontiers in Microbiology*, vol. 9:1260.
2 Longin, C., Degueurce, C., Julliat, F., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., and Alexandre, H. (2016). Efficiency of population-dependent sulfite against *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. *Food Res. Int.* 89(Pt 1), 620–630.
3 Serpaggi, V., Remize, F., Recorbet, G., Gaudot-Dumas, E., Sequeira-Le Grand, A., Alexandre, H., (2012). Characterization of the 'Viable but Nonculturable' (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces. Food Microbiology*, vol. 30, no. 2, 2012, pp. 438–447.
4 Tek, E.L., Sundstrom, J.F., Gardner, J.M., Oliver, S.G., Jiranek, V., 2018. Evaluation of the ability of commercial wine yeasts to form biofilms (mats) and adhere to plastic: implications for the microbiota of the winery environment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94.
5 Flemming, H.-C., Wingender, J., (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633.
6 Lebleux, Manon, Abdo, H., Coelho, C., Basmaciyan, L., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Roullier-Gall, C., 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.
7 Institut Français du Vin, (2016). Guide de bonnes pratiques d'hygiène filière vins. R36.5, p.66-73.