IVES Technical Reviews
viña & vino

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

¿Qué tipo de sanitización debiese aplicarse para remover los biofilms de *Brettanomyces bruxellensis*?

>>> Se confirmó la capacidad de cinco cepas de *Brettanomyces bruxellensis* para formar biofilms en acero inoxidable, y la sanitización de estos biofilms fue testeada usando una solución de ácido láctico y un método de referencia (una solución de soda cáustica espumosa y peróxido al 5 %). Se observaron diferentes respuestas dependiendo de la cepa: la solución de ácido láctico indujo una ligera reducción en la población celular, mientras que el método de referencia resultó en la eliminación de las células adheridas para tres cepas, pero generó estados VPNC para otras dos. Los efectos de la sanitización en el biofilm formado es dependiente de la cepa. <<<

La sanitización de la bodega representa la base de las pautas para controlar las contaminaciones microbianas y, en particular, la contaminación por *Brettanomyces bruxellensis*. En efecto, esta levadura contaminante es capaz de sobrevivir bajo condiciones de estrés; por ejemplo, en presencia de sulfitos[1, 2, 3]. La habilidad para formar biofilms es potencialmente una estrategia de resistencia desarrollada por algunas levaduras[4], aunque hasta ahora se ha prestado poca atención al caso de *B. bruxellensis*. Los biofilms se definen como una comunidad de uno o más tipos de microorganismos, los cuales se adhieren a superficies tanto bióticas como abióticas y que pueden crecer en las tres dimensiones, además de encontrarse incorporados en una matriz autoproducida llamada SPE (Sustancias Poliméricas Extracelulares)[5]. Un estudio reciente llevado a cabo en el IUVV (Dijon, Francia) describió el biofilm de *B. bruxellensis* como una estructura fina que consiste en diferentes morfologías celulares, incluyendo células de levadura y células pseudo-filamentosas incorporadas en una matriz extracelular (Figura 1)[6]. Asimismo, se demostró la persistencia de células de biofilm en superficies a lo largo del tiempo.

En la actualidad, el proceso más comúnmente utilizado para limpiar tanques es la aplicación una mezcla de soluciones químicas diluidas que contienen detergentes alcalinos y soluciones ácidas[7]. Por consiguiente, se están buscando alternativas ecorresponsables que sean efectivas para combatir todas las formas supervivientes de *B. bruxellensis*, con el fin de reducir el uso de químicos en la industria vinícola. En este contexto, nos hemos propuesto estudiar el impacto de dos métodos de sanitización diferentes (una solución de soda cáustica espumosa y peróxido al 5 % y una solución de ácido láctico al 5 %) en cepas de *Brettanomyces* desarrolladas en biofilm.

■ Buscando la remoción de biofilms de *Brettanomyces bruxellensis*

Con la finalidad de evaluar diferentes métodos de sanitización, se evaluaron cinco cepas de *B. bruxellensis* de diferentes orígenes (Tabla 1) y para cada cepa se formaron biofilms de catorce días en chips de acero inoxidable en un medio sintético (medio Extracto de Levadura – Peptona – Dextrosa (YPD)), comúnmente utilizado para cultivar levaduras en laboratorios de investigación.

Antes de la formación del biofilm, se usaron cultivos iniciadores para asegurarse de que las células estuviesen en los mismos estados fisiológicos, permitiendo la comparación precisa de la habilidad de diferentes cepas para formar biofilms. De hecho, las cinéticas de crecimiento son dependientes de la cepa, siendo la cepa BR17 más lenta comparada a las otras (Tabla 1). Por otro lado, la cepa GS04 fue la de crecimiento más rápido. No obstante, se confirmó la habilidad de todas las cepas investigadas para adherirse y formar un biofilm en chips de acero inoxidable, con una población inicial en el biofilm sobre el chip de alrededor de 106 células/cm² para todas las cepas al cabo de 14 días de incubación (Figura 2).

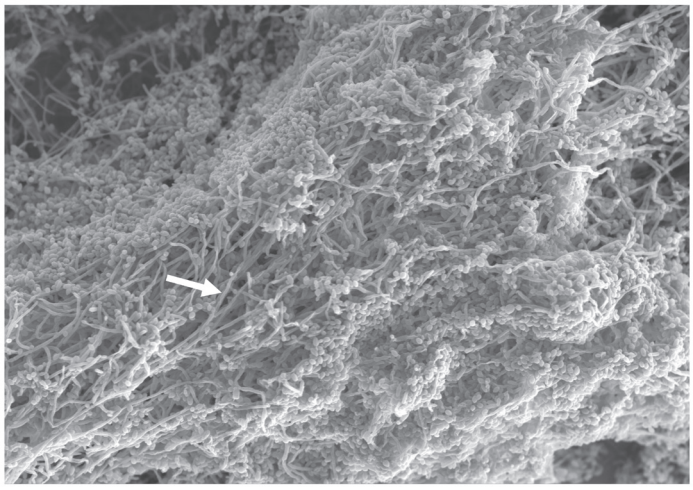


Figura 1. Observaciones por MEB (x 500) de un biofilm de un mes de *Brettanomyces bruxellensis* desarrollado en un chip de acero inoxidable en medio YPD. La superficie está cubierta de microcolonias que contienen levaduras y células filamentosas (indicadas por la flecha blanca).

Tabla 1. Orígenes y parámetros de crecimiento de las cepas de *B. bruxellensis*.

Cepa	Orígenes	Fase de adaptación (h)	Tiempo de generación (h)	Tasa de crecimiento μ (h^{-1})
S11	Vino de Borgoña (IUVV, Dijon)	40 ±8,021	11,36 ±4,867	0,097 ±0,042
S14	Vino de Borgoña (IUVV, Dijon)	27 ±1,732	18,47 ±4,265	0,056 ±0,013
BR17	Vino del Valle del Ródano (IR, Orange)	100 ±0,000	29,76 ±4,066	0,034 ±0,005
GS04	Vino del Valle del Ródano (IR, Orange)	27 ±0,000	12,15 ±0,156	0,08 ±0,001
GS12	Vino del Valle del Ródano (IR, Orange)	29 ±0,000	22,67 ±1,365	0,044 ±0,003

Fase de adaptación: periodo durante el cual el número de células permanece relativamente constante antes del crecimiento acelerado.
Tiempo de generación: tiempo que toma a los microorganismos para doblar su número.
Tasa de crecimiento: cantidad en la cual una variable se incrementa en un periodo de tiempo dado.

El establecimiento y el lanzamiento de IVES Technical Reviews están respaldados por LabEx COTE mediante la convocatoria de proyectos «Transfer and valorization».

. Efecto del método de bodega

El método de bodega, o método de referencia usado por la bodega Inter Rhône, consiste en aplicar una solución de soda cáustica espumosa y peróxido al 5 %. En seguida, los biofilms fueron expuestos a esta solución por 15 min, y las poblaciones en el chip fueron determinadas en medio agar (población cultivable) y por citometría de flujo (población viable) al final del proceso de limpieza. No se detectaron células remanentes en los chips después del tratamiento de las cepas S11, GS04 y GS12, demostrando de este modo la efectividad de dicho método (Figura 2A). Sin embargo, para las cepas BR17 y S14, algunas células viables fueron detectadas por citometría de flujo, revelando así la presencia de células en estado viable pero no cultivable (VPNC)[3].

. Efecto del ácido láctico

Con el fin de investigar un procedimiento alternativo de limpieza para el equipamiento de vinificación, se evaluó un enfoque ecorresponsable. Los biofilms fueron tratados con una solución de ácido láctico al 5 % por 15 min, y las poblaciones en chips de acero inoxidable fueron determinadas como descrito previamente. Los resultados muestran una reducción significativa en la población de células cultivables en los chips después del tratamiento con ácido láctico para todas las cepas, excepto para la cepa GS12 (Figura 2B). Sin embargo, este tratamiento no eliminó todas las células.

Estos ensayos demuestran diferentes comportamientos dependientes de la cepa y del tratamiento. La cepa GS12 pareciese ser ligeramente más tolerante que las otras cepas al tratamiento con ácido láctico. Por otro lado, las cepas BR17 y S14 parecen ser más tolerantes al método de bodega con inducción del estado VPNC, mientras que las poblaciones de las otras tres cepas fueron totalmente eliminadas. Este estado VPNC podría explicar la resistencia de estas dos cepas a diferentes productos químicos y podría ser la causa de la recontaminación de los tanques año a año, ya que las células pueden resucitar desde el estado VPNC cuando las condiciones de estrés desaparecen.

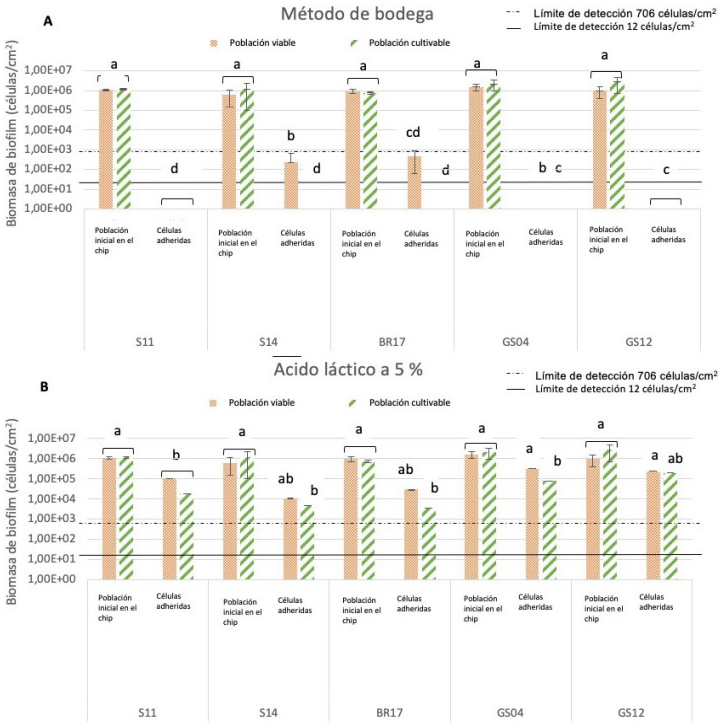


Figura 2. Concentración de poblaciones celulares viables o cultivables (células/cm²) de las cinco cepas de *B. bruxellensis* al final de los procesos de sanitización por método de bodega (A) y ácido láctico al 5 % (B). El término "células adheridas" corresponde a las células sujetas a la superficie del chip después del tratamiento. Las diferentes letras representan los niveles de significancia (p-valores ≤ 0,05) entre las poblaciones celulares adheridas a los chips. Límite de detección de las técnicas: 706 células/cm² (citómetro: viable; línea punteada), 12 células/cm² (placa: cultivable; línea continua).

■ Conclusión

Todas las cepas testeadas, sin importar su origen, fueron capaces de formar biofilms en acero inoxidable (alrededor de 106 células/cm²) luego de 14 días de incubación en medio YPD. Actualmente, la solución de ácido láctico no es un tratamiento lo suficientemente severo como para erradicar *B. bruxellensis*, pero es un enfoque promisorio, que podría ser mejorado incrementando el tiempo de contacto o la concentración de la solución. El método de bodega demostró su efectividad, pero dos cepas generaron células VPNC después del tratamiento. Estos resultados muestran que, tal como el SO_2[2, 3, 4], la sanitización representa un estrés para las levaduras, con una respuesta dependiente de la cepa. El desarrollo de métodos de detección baratos y fiables que sean reproducibles a nivel de cepa podría permitir la predicción y el control de las contaminaciones por *B. bruxellensis*. ■

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.