IVES Technical Reviews
vinha & vinho

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

Que tipo de higienização deve ser aplicada para remover biofilmes de *Brettanomyces bruxellensis*?

>>> Confirmou-se a capacidade de cinco estirpes de *Brettanomyces bruxellensis* de formarem um biofilme em aço inoxidável e testou-se a higienização destes biofilmes, através de uma solução de ácido láctico e de um método de referência (uma solução de soda cáustica espumosa e peróxido a 5%). Foram observadas diferentes reações, consoante a estirpe: a solução de ácido láctico induziu uma ligeira redução da população celular, enquanto o método de referência conduziu à eliminação das células aderentes no caso de três das estirpes, embora tenha gerado estados viáveis, mas não cultiváveis (VBNC) no caso das duas restantes. Os efeitos da higienização sobre o biofilme formado dependem de cada estirpe. <<<

A higienização das adegas está no âmago das diretrizes de controlo de contaminações microbianas e, em particular, da contaminação pela *Brettanomyces bruxellensis*. De facto, esta levedura deteriorante é capaz de sobreviver em condições de stress, como, por exemplo, na presença de sulfitos[1, 2, 3]. A capacidade de formar um biofilme é uma potencial estratégia de resistência desenvolvida por certas leveduras[4], apesar de o caso da *B. bruxellensis* ter sido pouco estudado até ao presente. Os biofilmes definem-se como uma comunidade de um ou mais tipos de micro-organismos, que aderem a superfícies bióticas e abióticas e podem crescer nas três dimensões, incorporados numa matriz autoproduzida designada por SPE (Substâncias Poliméricas Extracelulares)[5]. Num estudo recente, levado a cabo no IUVV (Dijon, França), o biofilme da *B. bruxellensis* foi descrito como uma estrutura fina, que consiste em diferentes morfologias celulares, incluindo células de levedura e células pseudofilamentosas incorporadas numa matriz extracelular (Figura 1)[6]. Além disso, demonstrou-se a persistência de células do biofilme em superfícies ao longo do tempo.

Atualmente, o processo de limpeza de cubas mais comum consiste na aplicação de uma mistura de soluções químicas diluídas que contêm detergentes alcalinos e soluções ácidas[7]. No entanto, tem-se procurado alternativas ecológicas que sejam eficazes no combate a todas as formas de sobrevivência da *B. bruxellensis* , de modo a reduzir a utilização de químicos no setor vinícola. Neste contexto, pretendeu-se estudar o impacto de dois métodos distintos de higienização (uma solução de soda cáustica espumosa e peróxido a 5 % e uma solução de ácido láctico a 5 %) sobre as estirpes de *Brettanomyces* desenvolvidas no biofilme.

■ Tentativa de remoção de biofilmes de *Brettanomyces bruxellensis*

Foram utilizadas cinco estirpes de *B. bruxellensis* de diversas origens (Tabela 1) e, para cada estirpe, formados biofilmes com catorze dias de idade, sobre aparas de aço inoxidável, num meio sintético (Extrato de Levedura-Peptona-Dextrose (YPD)), comummente utilizado para a cultura de leveduras em laboratórios de investigação, de modo a avaliar dois métodos diferentes de higienização. Anteriormente à formação de biofilmes, assegurou-se, por meio de inóculos, que as células se encontrassem no mesmo estado fisiológico, possibilitando uma comparação exata da capacidade de formação de biofilmes de diferentes estirpes. De facto, a cinética do crescimento depende de cada estirpe, sendo a BR17 mais lenta do que as restantes (Tabela 1). Por outro lado, a estirpe GS04 registou o crescimento mais rápido. Contudo, confirmou-se a capacidade de aderência e de formação de biofilme em aparas de aço inoxidável de todas as estirpes investigadas, com uma população inicial, no biofilme da apara, em torno das 106 células/cm², em todos os casos, após 14 dias de incubação (Figura 2).

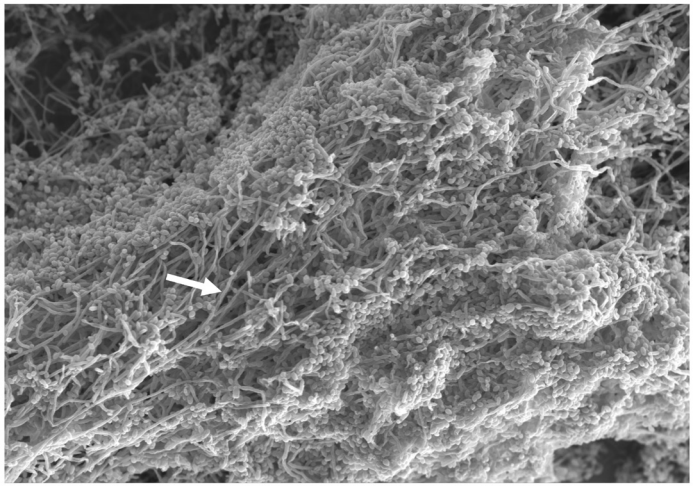


Figura 1. Observações por MEV (x 500) de um biofilme de *Brettanomyces bruxellensis* com um mês de idade, desenvolvido sobre uma apara de aço inoxidável, num meio YPD. A superfície está coberta de microcolónias, que contêm levedura e células filamentosas (indicadas por uma seta branca).

Tabela 1. Origem e parâmetros de crescimento das estirpes de *B. bruxellensis*.

Estirpe	Origem	Fase intermédia (h)	Período de incubação (h)	Taxa de crescimento μ (h^{-1})
S11	Vinho da Borgonha (IUVV, Dijon)	40 ±8,021	11,36 ±4,867	0,097 ±0,042
S14	Vinho da Borgonha (IUVV, Dijon)	27 ±1,732	18,47 ±4,265	0,056 ±0,013
BR17	Vinho do Vale do Ródano (IR, Orange)	100 ±0,000	29,76 ±4,066	0,034 ±0,005
GS04	Vinho do Vale do Ródano (IR, Orange)	27 ±0,000	12,15 ±0,156	0,08 ±0,001
GS12	Vinho do Vale do Ródano (IR, Orange)	29 ±0,000	22,67 ±1,365	0,044 ±0,003

Fase de latência: período durante o qual o número de células permanece relativamente constante, anterior ao rápido crescimento
Período de incubação: tempo necessário para a duplicação do número de células do micro-organismo durante um determinado período de tempo
Taxa de crescimento: valor do aumento de uma variável num determinado período de tempo

A preparação e o lançamento de Revisões Técnicas da IVES (IVES Technical Reviews) são apoiados pelo LabEx COTE através dos seus concursos para projetos de Transferência e valorização.

. O efeito do método da adega

O método da adega ou método de referência, utilizado pela cave da Inter Rhône, consiste na aplicação de uma solução de soda cáustica espumosa e peróxido a 5%. No final do processo de limpeza, os biofilmes foram, deste modo, expostos à referida solução durante 15 min. e as populações da apara foram determinadas em meios de ágar (população cultivável) e por citometria de fluxo (população viável). Não foram detetadas quaisquer células restantes nas aparas após o tratamento de três estirpes, S11, GS04 e GS12, comprovando-se, assim, a eficácia deste método (Figura 2A). Porém, no caso das estirpes BR17 e S14, foram detetadas algumas células viáveis por citometria de fluxo, tendo-se revelado, deste modo, a existência de células num estado viável, mas não cultivável (VBNC)[3].

. O efeito do ácido láctico

De modo a investigar um procedimento alternativo de limpeza de equipamentos vinícolas, testou-se uma abordagem ecológica. Os biofilmes foram tratados com uma solução de ácido láctico a 5%, durante 15 min., e as populações das aparas de aço inoxidável foram determinadas da forma anteriormente descrita. Os resultados evidenciam uma redução significativa da população de células cultiváveis nas aparas após o tratamento com ácido láctico, em todos os casos, exceto no da estirpe GS12 (Figura 2B). No entanto, este tratamento não eliminou a totalidade das células.
Estes ensaios demonstram um comportamento diferente consoante as estirpes e o tipo de tratamento. A estirpe GS12 parece ser ligeiramente mais tolerante do que as restantes ao método do ácido láctico.

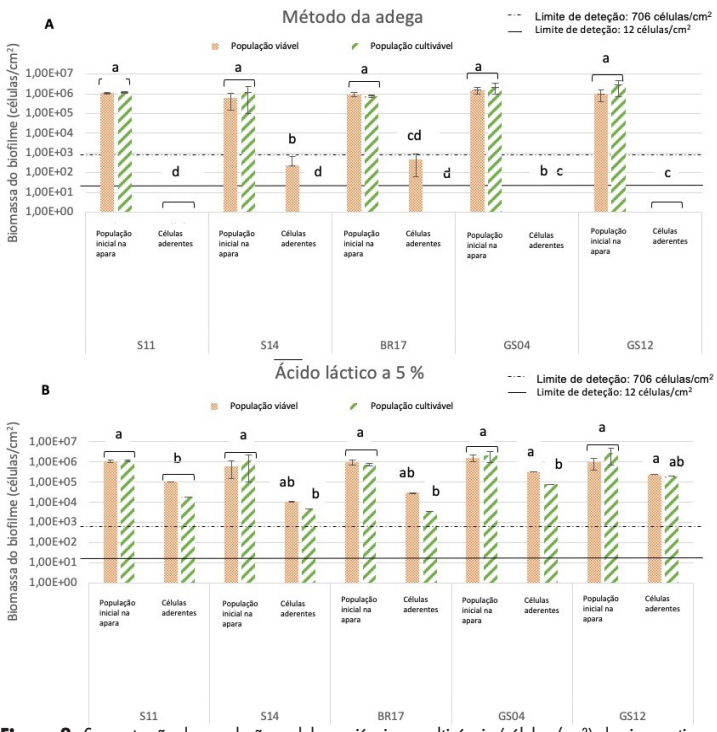


Figura 2. Concentração de populações celulares viáveis ou cultiváveis (células/cm²) de cinco estirpes da *B. bruxellensis* após o processo de higienização de acordo com o método da adega (A) e com ácido láctico a 5 % (B). O termo "células aderentes" corresponde às células fixas à superfície da apara após o tratamento. As diferentes letras representam uma diferença significativa (valores de $P \leq 0,05$) entre as populações celulares que aderiram às aparas. Limite de deteção das técnicas: 706 células/cm² (citómetro: viáveis; linha tracejada), 12 células/cm² (placa: cultiváveis; linha contínua).

Por outro lado, as estirpes BR17 e S14 aparentam uma maior tolerância ao método da adega, mediante a indução do estado VBNC, ao passo que as populações das três outras estirpes foram totalmente erradicadas. Este estado VBNC poderá explicar a resistência destas duas estirpes a diversos produtos químicos e ser a causa da recontaminação anual das cubas, uma vez que as células podem recuperar do estado VBNC após o desaparecimento das condições de stress.

■ Conclusão

Todas as estirpes testadas, não obstante a origem, foram capazes de formar biofilmes em aço inoxidável (cerca de 106 células/cm²), após 14 dias de incubação num meio YPD. Atualmente, a solução de ácido láctico não é um tratamento suficientemente rigoroso para erradicar a *B. bruxellensis*, embora constitua uma abordagem promissora, que poderá ser melhorada através do aumento do período de contacto ou da concentração da solução. O método da adega demonstrou a sua eficácia, apesar de duas estirpes exibirem células VBNC após o tratamento. Estes resultados comprovam que, tal como no caso do SO_2[2, 3, 4], a higienização representa um fator de stress para leveduras com uma reação dependente da estirpe. O desenvolvimento de métodos económicos e fiáveis de deteção que sejam reproduzíveis ao nível das estirpes poderá permitir a previsão e o controlo da contaminação pela *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.