IVES Technical Reviews
vigna & vino

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

Che tipo di igiene dovrebbe essere effettuata per rimuovere i biofilm di *Brettanomyces bruxellensis*?

>>> La capacità di cinque ceppi di *Brettanomyces bruxellensis* di formare biofilm su acciaio inossidabile è stata confermata e la disinfezione di questi biofilm è stata studiata utilizzando una soluzione di acido lattico e un metodo di riferimento (una soluzione di soda caustica e perossido al 5 %). Sono state osservate risposte diverse a seconda del ceppo: la soluzione di acido lattico ha indotto una leggera riduzione della popolazione cellulare, mentre il metodo di riferimento ha portato all'eliminazione delle cellule aderenti per tre ceppi, ma ha generato stati VBNC per gli altri due. Gli effetti della sanificazione sul biofilm formato dipendono dal ceppo. <<<

La sanificazione delle cantine è il fattore chiave per il controllo delle contaminazioni microbiche e, in particolare, della contaminazione da *Brettanomyces bruxellensis*[1, 2, 3]. In effetti, questo lievito alterante è in grado di sopravvivere in condizioni di stress; ad esempio, in presenza di solfiti. La capacità di formare biofilm è una potenziale strategia di resistenza sviluppata da alcuni lieviti[4], sebbene finora sia stata prestata poca attenzione al caso di *B. bruxellensis*. I biofilm sono definiti come una comunità di uno o più tipi di microrganismi, che aderiscono a superfici biotiche e abiotiche, che possono svilupparsi su una superfice, e che sono incorporati in una matrice autoprodotta chiamata EPS (Sostanze Polimeriche Extracellulari)[5]. Un recente studio condotto presso l'IUVV (Digione, Francia) ha descritto il biofilm di *B. bruxellensis* come una pellicola sottile costituita da diverse morfologie cellulari, comprese cellule di lievito e cellule pseudo-filamentose incorporate in una matrice extracellulare (Figura 1)[6]. Inoltre, è stata dimostrata la persistenza nel tempo delle cellule del biofilm sulle superfici.
Attualmente, il processo più comunemente utilizzato per la pulizia delle vasche è l'applicazione di una miscela di soluzioni chimiche diluite contenenti detergenti alcalini e soluzioni acide[7]. Tuttavia, si cercano alternative ecologiche efficaci per combattere le diverse forme di *B. bruxellensis* al fine di ridurre l'uso di sostanze chimiche nell'industria vinicola. In questo contesto si è cercato di studiare l'impatto di due diversi metodi di sanificazione (una soluzione di soda caustica e perossido al 5 % e una soluzione di acido lattico al 5 %) su biofilm di ceppi di *Brettanomyces*.

■ Test per rimuovere i biofilm di *Brettanomyces bruxellensis*

Per valutare l'impatto di due diversi metodi di sanificazione, sono stati utilizzati cinque ceppi di *B. bruxellensis* di diversa origine (Tabella 1) e per ogni ceppo si sono formati biofilm di quattordici giorni su porzioni di acciaio inossidabile contenente un terreno di coltura (terreno di estratto di lievito-peptone-destrosio (YPD)), comunemente usato per la coltura di lieviti nei laboratori di ricerca.
Prima della formazione del biofilm, le colture starter hanno permesso di ottenere delle cellule con lo stesso stato fisiologico, consentendo il confronto accurato della capacità di diversi ceppi di formare il biofilm. Si osserva che la cinetica di crescita dipende dal ceppo e il ceppo BR17 è più lento rispetto agli altri ceppi (Tabella 1). D'altra parte, la varietà GS04 è stata la più rapida a crescere. Tuttavia, la capacità di tutti i ceppi studiati di aderire e formare un biofilm su una porzione di acciaio è stata confermata a partire da una popolazione iniziale di circa 106 cellule/cm² dopo 14 giorni di incubazione (Figura 2).

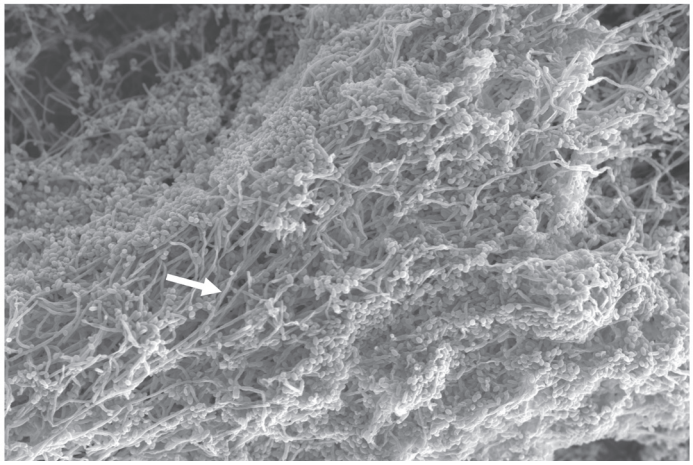


Figura 1. Osservazione al SEM (microscopio elettronico, X 500) di un biofilm di un mese di *Brettanomyces bruxellensis* sviluppato su un pezzo di acciaio inossidabile contenente il terreno liquido YPD. La superficie è ricoperta da microcolonie contenenti lievito e cellule filamentose (indicate da freccia bianca).

Tabella 1. Origini e parametri di crescita dei ceppi di *B. bruxellensis*.

Ceppo	Origine	Fase di latenza (h)	Tempo di generazione (h)	Velocità di crescita μ (h^{-1})
S11	Vino di Borgogna (IUVV, Digione)	40 ±8,021	11,36 ±4,867	0,097 ±0,042
S14	Vino di Borgogna (IUVV, Digione)	27 ±1,732	18,47 ±4,265	0,056 ±0,013
BR17	Vino di valle di Rhône (IR, Orange)	100 ±0,000	29,76 ±4,066	0,034 ±0,005
GS04	Vino di valle di Rhône (IR, Orange)	27 ±0,000	12,15 ±0,156	0,08 ±0,001
GS12	Vino di valle di Rhône (IR, Orange)	29 ±0,000	22,67 ±1,365	0,044 ±0,003

Fase di latenza: periodo nel quale il numero di cellule rimane costante prima della crescita rapida.
Tempo di generazione: tempo impiegato dai microorganismi per raddoppiare la loro popolazione in un tempo preciso.
Velocità di crescita: variazione del numero di cellule o della massa cellulare per unità di tempo.

La traduzione di questo articolo in italiano vi stata offerta da WineHunter Hub (https://www.winehunterhub.com/).

. L'effetto del metodo vinicolo

Il metodo classico di cantina, o metodo di riferimento utilizzato dalla cantina Inter Rhône, consiste nell'applicare una soluzione di soda caustica e perossido al 5 %. I biofilm sono stati quindi esposti a questa soluzione per 15 minuti e le popolazioni presenti sulla porzione d'acciaio sono state determinate su terreno agar (popolazione coltivabile) e mediante citometria a flusso (popolazione vitale) alla fine del processo di pulizia. Non sono state rilevate cellule rimanenti sull' acciaio dopo il trattamento dei tre ceppi S11, GS04 e GS12, dimostrando così l'efficacia di questo metodo (Figura 2A). Tuttavia, per i ceppi BR17 e S14, alcune cellule vitali sono state rilevate mediante citometria a flusso, rivelando così cellule in uno stato vitale ma non coltivabili (VBNC)[3].

. L'effetto dell'acido lattico

Per studiare una procedura di pulizia alternativa per sanificare le attrezzature della vinificazione, è stato provato un approccio ecologico. I biofilm sono stati trattati con una soluzione di acido lattico al 5 % per 15 minuti e le popolazioni sul pezzo di acciaio inossidabile sono state determinate come descritto in precedenza. I risultati mostrano una riduzione significativa della popolazione di cellule coltivabili sul supporto in acciaio dopo il trattamento con acido lattico per tutti i ceppi, ad eccezione del ceppo GS12 (Figura 2B). Tuttavia, questo trattamento non ha eliminato tutte le cellule.
Questi test dimostrano un comportamento dipendente dal ceppo e dal trattamento. Il ceppo GS12 sembra essere leggermente più tollerante all'acido lattico rispetto agli altri ceppi. D'altra parte, i ceppi BR17 e S14 sembrano essere più tolleranti al metodo classico con l'induzione dello stato VBNC, mentre le popolazioni degli altri tre ceppi sono state totalmente eliminate. Questo stato VBNC potrebbe spiegare la resistenza di questi due ceppi a diversi prodotti chimici e potrebbe essere la causa della contaminazione delle vasche anno dopo anno, poiché le cellule possono rianimarsi dallo stato VBNC quando le condizioni di stress scompaiono.

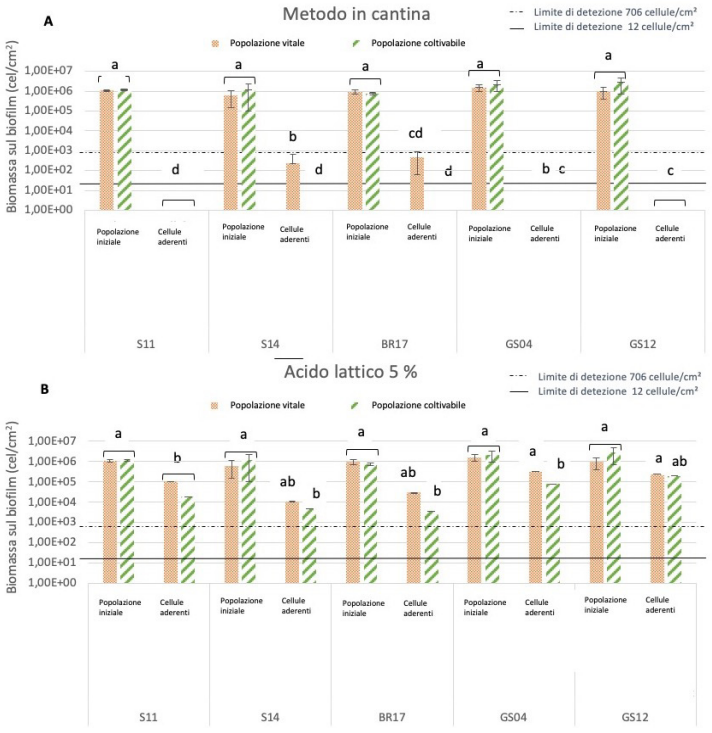


Figura 2. Concentrazione delle popolazioni cellulari vitali o coltivabili (cellule/cm²) di cinque ceppi di *B. bruxellensis* a seconda del metodo di sanificazione in cantina (A) e con acido lattico 5 % (B). Il termine "cellule aderenti" corrisponde alle cellule che rimangono sulla superficie del piano di acciaio dopo il trattamento. Le lettere diverse rappresentano una differenza significativa (valori di $p \leq 0,05$) tra le popolazioni cellulari sul piano. Limite di rilevamento della tecnica: 706 cellule/cm² (citometria: vitali; linea tratteggiata), 12 cellule/cm² (piastra: coltivabili; linea piena).

■ Conclusione

Tutti i ceppi testati, indipendentemente dall'origine, sono stati in grado di formare biofilm su acciaio inossidabile (circa 106 cellule/cm²) dopo 14 giorni di incubazione in un mezzo YPD. Attualmente, la soluzione di acido lattico non è un trattamento abbastanza efficace per eliminare *B. bruxellensis*, ma è un approccio promettente, che potrebbe essere migliorato aumentando il tempo di contatto o la concentrazione della soluzione. Il metodo classico usato in cantina ha dimostrato la sua efficacia, ma due ceppi hanno mostrato cellule VBNC dopo il trattamento. Questi risultati mostrano che, come per il diossido di zolfo (SO_2)[2, 3, 4], l'igiene rappresenta uno stress per il lievito con una risposta dipendente dal ceppo. Lo sviluppo di metodi di rilevamento economici e affidabili che siano riproducibili a livello di ceppo potrebbe consentire di prevedere e controllare la contaminazione da *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.