



HAL
open science

Biodiversité fongique dans une nouvelle cuverie et dynamique des populations en cuverie (*Saccharomyces cerevisiae*) et en cave d'élevage (*Brettanomyces bruxellensis*)

Hany Abdo

► **To cite this version:**

Hany Abdo. Biodiversité fongique dans une nouvelle cuverie et dynamique des populations en cuverie (*Saccharomyces cerevisiae*) et en cave d'élevage (*Brettanomyces bruxellensis*). Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Bourgogne Franche-Comté, 2020. Français. NNT : 2020UBFCK018 . tel-03023008

HAL Id: tel-03023008

<https://theses.hal.science/tel-03023008>

Submitted on 25 Nov 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE
BOURGOGNE FRANCHE-COMTE**

**Préparée à l'Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Jules Guyot,
UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Equipe Vin Aliments Microbiologie et Stress**

Ecole doctorale n°554

Ecole Doctorale Environnements - Santé

Doctorat en Sciences de l'alimentation

Spécialité : Biochimie et biologie moléculaire

Par

Hany ABDO

**Biodiversité fongique dans une nouvelle cuverie et dynamique
des populations en cuverie (*Saccharomyces cerevisiae*) et en
cave d'élevage (*Brettanomyces bruxellensis*)**

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 25 Mai 2020

Membres du Jury :

Pr. Nicolas ROZÈS	Universitat Rovira i Virgili	Rapporteur
Dr. Jean-Luc LEGRAS	INRAe Montpellier	Rapporteur
Pr. Hervé ALEXANDRE	Université de Bourgogne	Examineur
Pr. Jean GUZZO	Université de Bourgogne	Président
Pr. Yvan MOËNNE-LOCCOZ	Université Claude Bernard Lyon 1	Examineur
Dr. Marina BELY	Université de Bordeaux	Examineur
Dr. Sandrine ROUSSEAU	Université de Bourgogne	Directrice de thèse
Dr. Michèle GUILLOUX-BENATIER	Université de Bourgogne	Co-directrice de thèse

Titre : Biodiversité fongique dans une nouvelle cuverie et dynamique des populations en cuverie (*Saccharomyces cerevisiae*) et en cave d'élevage (*Brettanomyces bruxellensis*)

Mots clés : biodiversité fongique, nouvelle cuverie, *Saccharomyces cerevisiae*, cave d'élevage, *Brettanomyces bruxellensis*

Résumé : La biodiversité fongique interspécifique (Illumina Mi-Seq) et la dynamique des espèces *Saccharomyces cerevisiae* et *Brettanomyces bruxellensis* ont été étudiées au sein d'une nouvelle cuverie et/ou dans 3 caves d'élevage, plus particulièrement sur le sol, les murs, le matériel vinaire et l'extérieur des fûts. Dans la nouvelle cuverie, un consortium fongique (levures et moisissures) de départ est déjà présent sur tous les environnements étudiés avant l'arrivée de la première vendange. Ce consortium est constitué de genres tels que *Aureobasidium*, *Alternaria*, *Didymella* et *Filobasidium*. Ces genres qui persistent pendant deux millésimes, ne sont pas spécifiques de l'environnement de la cuverie et semblent être adaptés à tous les environnements naturels ou anthropiques au regard de leur caractère ubiquiste. Le consortium de départ est enrichi par des genres œnologiques (exemple : *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*) qui sont introduits dans la cuverie soit par les vendanges, soit par des transferts potentiels entre les différents environnements de la cuverie. Cependant, ces genres ne semblent pas persister ou s'implanter probablement dû à leur faible adaptation aux conditions stressantes de l'environnement de la cuverie. La dynamique de la flore indigène *S. cerevisiae* dans la nouvelle cuverie a été également étudiée. Aucun isolat appartenant à cette espèce n'a été retrouvé avant l'arrivée de la première vendange confirmant que cette espèce n'est pas spécifique de l'environnement de la cuverie et que sa présence est en lien avec l'activité des fermentations alcooliques. Cependant, les résultats obtenus suggèrent une colonisation potentielle de l'environnement de la nouvelle cuverie par certaines souches de *S. cerevisiae*. Ces souches dites « colonisatrices » ont présenté une capacité plus élevée à former des biofilms comparée à celle de souches non implantées. Cette étude met en évidence l'importance de l'environnement de la cuverie qui constitue une véritable niche écologique pour les populations fongiques capables de s'implanter au cours du processus de vinification. Dans l'environnement des 3 caves d'élevage, le matériel vinaire et l'extérieur des fûts (en contact direct avec le vin) sont les environnements qui semblent favorables au développement et à l'installation des populations microbiennes cultivables (levures totales et bactéries lactiques) et des microorganismes d'altération (bactéries acétiques et *B. bruxellensis*), contrairement au sol et aux murs où des populations faibles ont été trouvées. Des souches récurrentes de *B. bruxellensis* ont été retrouvées sur le matériel et sur l'extérieur des fûts et pourraient être à l'origine de la contamination de vins au cours de l'élevage. Ces souches récurrentes présentent des capacités de formation de biofilms et de résistance plus importantes qui pourraient expliquer la persistance de *B. bruxellensis* dans des caves d'élevage. Ces résultats soulignent l'importance du nettoyage du matériel vinaire et du suivi microbien régulier des vins au cours de l'élevage afin de limiter les contaminations.

Title : Fungal biodiversity in a new winery and population dynamics in the winery (*Saccharomyces cerevisiae*) and in aging cellar (*Brettanomyces bruxellensis*)

Keywords : fungal biodiversity, new winery, *Saccharomyces cerevisiae*, aging cellar, *Brettanomyces bruxellensis*

Abstract : The interspecific fungal biodiversity (Illumina Mi-Seq) and the dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* and *Brettanomyces bruxellensis* species were studied in a new winery and/or in 3 aging cellars, more specifically on the floor, the walls, the equipment and the outside of the barrels. In the new winery, an initial fungal consortium (yeasts and molds) is already present on all the winery environments before the arrival of the first harvest. This consortium consists of fungal genera such as *Aureobasidium*, *Alternaria*, *Didymella* and *Filobasidium*. These genera, that persist during two vintages, are not specific to the winery environment and seem to be adapted to natural or anthropic environments due to their ubiquitous character. The initial consortium is enriched by oenological genera (e.g. *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*) that are introduced into the winery either by the harvest or by potential transfers between the different environments of the winery. However, these genera do not seem to persist or establish due to their low adaptation to the stressful conditions of the winery environment. The dynamics of wild *S. cerevisiae* in the new winery was also studied. No isolates belonging to this species were found before the arrival of the first harvest, confirming that this species is not specific to the winery environment and its presence is related to the alcoholic fermentation activity. However, the results obtained suggest a potential colonization of the new winery environment by certain *S. cerevisiae* strains. These so-called « colonizing » strains showed a higher capacity to form biofilms compared to non-implanted strains. This study highlights the importance of the winery environment that constitutes a true ecological niche for fungal populations capable of implantation during the winemaking process. In the environment of the 3 aging cellars, the equipment and the outside of the barrels (in direct contact with wine) are the environments that seem to be favorable for the development and installation of cultivable microbial populations (yeasts and lactic acid bacteria) and spoilage microorganisms (acetic acid bacteria and *B. bruxellensis*), unlike the floor and the walls where low microbial populations were found. Recurrent strains of *B. bruxellensis* have been found on both the equipment and the outside of the barrels and could be the cause of wine contamination during aging. These recurrent strains showed greater biofilm formation and resistance capacities which could explain the persistence of *B. bruxellensis* in aging cellars. These results highlight the importance of equipment cleaning and the regular monitoring of wines during aging in order to limit the contaminations.

A la mémoire de mon père ...

Remerciements

Tout d'abord, je remercie la région Bourgogne Franche-Comté et le Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB) pour leur soutien financier sans lequel ces travaux de recherche n'auraient pas pu être réalisés.

J'adresse toutes mes reconnaissances au Professeur Nicolas Rozès, de l'Universitat Rovira i Virgili de Tarragon, et au Docteur Jean-Luc Legras, de l'INRAe de Montpellier, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je voudrais, témoigner toute ma gratitude aux Professeurs Hervé Alexandre, Jean Guzzo et Yvan Moëgne-Loccoz, ainsi qu'au Docteur Marina Bely pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je remercie aussi Professeur Isabelle Masneuf-Pomarède et Monsieur Vincent Gerbaux pour leurs conseils lors des comités de suivi de thèse.

J'exprime mes remerciements à ma directrice de thèse Sandrine Rousseaux et ma co-directrice de thèse Michèle Guilloux-Bénatier pour leur disponibilité et leur aide pendant ces trois années de thèse. Leur encadrement et leurs précieux conseils m'ont permis de mener à bien cette thèse.

Ce travail est le fruit d'une collaboration avec le laboratoire de Biologie à l'Université de Bari. *First of all, a big thank you to Professor Mario Ventura to his kindness, advice and for welcoming me in an exceptional way within his research team. I would also like to thank Claudia Catacchio for all the experiments we conducted in a good mood even though the results were not always as good as expected. To Pietro D'Addabbo and Francesco Maria Calabrese thank you very much for introducing me to the world of bioinformatics. Your explanations and advices in using the developed pipelines in the laboratory were very helpful. I would like to thank the different members of the team that I had the opportunity to work with, especially Matteo Velenossi (good luck for your thesis defense) and Nicolas Lorusso (good luck for the future).*

Je veux remercier chaleureusement les stagiaires que j'ai côtoyé, Baptiste Pierre, Laurine Laroche et Antoine Berland. Votre aide fut très précieuse dans l'avancement de ce travail de thèse. Je remercie également Manon Lebleux qui a effectué son stage de M2 avec moi et qui est maintenant ma collègue :). Même si je n'étais présent que pendant les deux premiers mois de ton stage (j'espère que tu ne m'en voudras pas), j'ai beaucoup apprécié de travailler et échanger avec toi. Il est difficile de trouver quelqu'un de plus motivé que toi.

Une pensée particulière à mon gang préféré, Frédérique, Alexandre, Arnaud, Florian, Solène, Peio et Fanny qui nous a récemment rejoint. Merci de m'avoir soutenue au cours de cette thèse, et surtout merci d'avoir réussi à me supporter et la « non communication » inhérente à ma personne au jour le jour :) (je vous promets de répondre à vos appels et SMS plus souvent).

Je tiens à remercier l'ensemble des doctorants de l'équipe VAIMiS (vous ne m'en voudrez pas de ne pas vous lister, j'ai peur d'en oublier) pour l'ambiance agréable du labo, sans laquelle les journées seraient extrêmement longues. Je remercie également l'équipe des doctorants de l'INRA, Mayssa, Elise, Remy et Karen avec qui c'était toujours un plaisir de se retrouver.

Comme la vie ne se résume pas au labo, je remercie mes potes qui m'ont encouragé, soutenu et ont rendu mon séjour à Dijon plus agréable. Marie, Tamara, Jana, Hania et Farah vous êtes géniaux. Je pense également à mes *travel buddies* avec qui j'ai pu partager des moments inoubliables, merci Céline, Bernard et Hiba. Je remercie de tout mon cœur mon ami d'enfance Hajj N2oula. Merci d'avoir toujours été là et d'avoir cru en moi. Je n'oublie pas mes amis de la faculté, Rami, Michella, Céline, Guitta, Claudia, Julie, Nathalie et Antoine (bon courage pour ta thèse).

Mes derniers remerciements vont à ma famille. Merci maman de m'avoir toujours soutenu dans mes choix, je n'en serai jamais arrivé là sans toi. Merci à mon « petit » frère Emile qui m'a poussé à faire une thèse et a ensuite fait semblant de s'intéresser à mon sujet. *And last but certainly not least*, merci à toi Martine, merci pour ton soutien inconditionnel, merci d'avoir toujours cru en moi, même et surtout, quand je n'y croyais pas moi-même.

Table des matières

Liste des abréviations	11
Liste des figures	12
Liste des tableaux	14
Valorisation des travaux réalisés	15
Introduction générale	17
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	23
Partie 1 : Biodiversité microbienne et méthodes d’analyses	25
1. Biodiversité microbienne : définition et caractérisation	25
2. Les méthodes d’analyse de la biodiversité	27
2.1 Les méthodes d’analyse de la biodiversité dans la filière viti-vinicole	28
Partie 2 : Les populations microbiennes résidentes dans les environnements reliés au vin	47
1. Biodiversité microbienne dans une cuverie en production	47
1.1 Par les méthodes non-NGS	47
1.2 Par les méthodes NGS	51
1.3 Persistance des populations levuriennes des WREs de cuverie en production.....	51
1.4 Implication des populations levuriennes isolées des WREs de cuverie en production dans le processus de vinification	52
2. Biodiversité microbienne dans une cave d’élevage	52
2.1 Par les méthodes non-NGS	Error! Bookmark not defined.
2.2 Par les méthodes NGS	56
3. Quid d’une nouvelle cuverie/cave ?	56
Partie 3 : Mécanismes et facteurs contribuant à la survie et à la persistance des populations fongiques dans les environnements reliés au vin	57
1. Les interactions fongiques.....	57
1.1 Généralités	57
1.2 La compétition	59
1.3 L’amensalisme	59
1.4 Quorum sensing	63
2. Mécanismes d’adaptation à l’environnement.....	63
2.1 Métabolisme levurien.....	63
2.2 Le changement de morphologie.....	65
2.3 La capacité à sporuler	66

2.4	L'état VNC.....	67
2.5	Biofilms.....	68
3.	Facteurs influençant la persistance des microorganismes.....	70
3.1	Influence des facteurs abiotiques (température, éthanol, pH).....	71
3.2	Influence des activités anthropiques	72
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes		75
1.	Echantillonnage du matériel biologique	77
1.1	Nouvelle cuverie.....	77
1.1.1	Environnements de la cuverie	77
1.1.2	Moûts de raisin/vins	79
1.2	Caves d'élevage en production.....	80
2.	Isolement, culture et conservation des microorganismes	83
3.	Identification des populations fongiques	84
3.1	Identification des populations fongiques par séquençage haut débit	84
3.1.1	Extraction d'ADN	84
3.1.2	Amplification de la région ITS et séquençage Illumina Mi-Seq.....	84
3.1.3	Analyse bio-informatique des séquences obtenues	86
3.2	Discriminations interspécifique et intraspécifique (espèces <i>Saccharomyces cerevisiae</i> et <i>Brettanomyces bruxellensis</i>).....	87
3.2.1	PCR-ITS	87
3.2.2	Identification et discrimination des souches de l'espèce <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	87
3.2.3	Identification et discrimination des souches de l'espèce <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	88
Chapitre 3 : Biodiversité et évolution du consortium fongique d'une nouvelle cuverie..		89
Chapitre 4 : Colonisation de l'environnement d'une nouvelle cuverie par l'espèce <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		105
Chapitre 5 : Biodiversité microbienne dans l'environnement de caves d'élevage		123
Conclusions et perspectives		155
Références bibliographiques		165
Annexes		207

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

ADNr : ADN ribosomique

CO₂ : Dioxide de carbone

dNTPs : Désoxyribonucléotides triphosphate

EPS : Extracellular Polymeric Substances

FA : Fermentation Alcoolique

GYC : Glucose Yeast Calcium carbonate

ITS : Internal Transcribed Spacer

NaCl : Chlorure de Sodium

NGS : Next Generation Sequencing

OTUs : Operational Taxonomic Units

pb : Paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

QS : Quorum Sensing

SO₂ : Dioxyde de soufre

UFC : Unité Formant Colonie

VNC : Viable Non-Cultivable

WGS : Whole Genome Sequencing

WREs : Wine Related Environments

YPD : Yeast Peptone Dextrose

Liste des figures

Figure 1 : Evolution du nombre annuel de publications scientifiques traitant de diversité microbienne de 1975 à 1997.	25
Figure 2 : (a) Présentation des diversités : α (diversité d'un écosystème), β (diversité comparative entre deux écosystèmes) et γ (diversité globale de plusieurs écosystèmes) (b) Illustration des biodiversités interspécifique et intraspécifique.	26
Figure 3 : Illustration du principe de la PCR-Interdelta utilisée pour étudier la diversité intraspécifique de l'espèce <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
Figure 4 : Evolution du nombre annuel de publications scientifiques utilisant des techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS) pour étudier la biodiversité microbienne dans la filière viti-vinicole.	40
Figure 5 : Principe de la technique de séquençage Illumina ciblé (Mi-Seq).....	45
Figure 6 : Les différents genres et espèces microbiennes identifiés (méthodes non-NGS  et  NGS) sur les environnements reliés au vin (sol, murs, air et matériel vinaire) d'une cuverie en production.	48
Figure 7 : Les différents genres et espèces microbiennes identifiés (méthodes non-NGS  et  NGS) sur les environnements reliés au vin (sol, murs, air et matériel vinaire) d'une cave d'élevage.	54
Figure 8 : Les différentes interactions directes et indirectes connues entre microorganismes.	58
Figure 9 : Facteurs biotiques et abiotiques contribuant aux interactions entre levures.	58
Figure 10 : Amensalisme entre les différentes populations fongiques.	61
Figure 11 : Les différentes étapes de sporulation chez les levures.	66
Figure 12 : Différentes étapes de développement d'un biofilm.	68
Figure 13 : Plan schématique de la nouvelle cuverie indiquant les prélèvements réalisés sur le sol pour le millésime 2016 (a) et pour les millésimes 2017 et 2018 (b).	78

Figure 14 : Localisation géographique des trois caves d'élevage suivies dans le cadre de cette étude. 80

Figure 15 : Différents logiciels et étapes utilisés par le pipeline PIPITS pour le traitement des séquences générées par séquençage Illumina Mi-Seq..... 86

Liste des tableaux

Tableau 1 : Méthodes d'analyse de la biodiversité microbienne utilisées dans la filière viti-vinicole.	29
Tableau 2 : Liste des genres de levures, bactéries, moisissures et champignons identifiés par les techniques non-NGS et NGS dans la filière viti-vinicole.	41
Tableau 3 : Surfaces et nombre de prélèvements effectués sur les différents environnements de la nouvelle cuverie.	78
Tableau 4 : Nombre d'échantillons moyens obtenus sur les différents environnements de la nouvelle cuverie.	79
Tableau 5 : Caractéristiques des trois caves et itinéraires techniques suivis par les vinificateurs.	81
Tableau 6 : Surfaces et nombre de prélèvements effectués sur les différents environnements des caves d'élevage en production.	82
Tableau 7 : Nombre d'échantillons moyens par millésime et par cave pour les différents environnements.	82
Tableau 8 : Amorces 'Phusion' et séquences code barre (Golay) utilisées pour le séquençage Illumina Mi-Seq.	85

Valorisation des travaux réalisés

Communications orales :

Abdo, H., Catacchio, CR., Ventura, M., Laurent, J., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S. **The fungal life of a new winery.** Forum des jeunes chercheurs, Dijon, France, 13-14 Juin 2019.

Lebleux, M., Abdo, H., Basmaciyani, L., Laurent, J., Rouiller-Gall, C., Coelho, C., Alexandre, H., Weidmann, S., Rousseaux, S. **Advances on *Brettanomyces* biofilms.** Forum des jeunes chercheurs, Dijon, France, 13-14 Juin 2019.

Abdo, H., Catacchio, CR., Ventura, M., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S. **Fungal resident flora of a new winery: colonization, dynamics and potential persistence capacities.** 11th International Symposium of Enology of Bordeaux, Oeno 2019, Bordeaux, France, 25-28 Juin 2019.

Rousseaux, S., Lebleux, M., Lhomme, C., Abdo, H., Degueurce, C., Serpaggi, V., Albertin, W., Maupeu, J., Alexandre, H., Weidmann, S. **Biofilms of *Brettanomyces bruxellensis* and sanitation.** 42nd World congress of vine and wine, Genève, Suisse, 15-19 Juillet 2019.

Communications affichées :

Abdo, H., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S. **Exploring indigenous yeast flora in a new winery: biodiversity and evolution over time.** Forum des jeunes chercheurs, Dijon, France, 15-16 Juin 2017.

Lebleux, M., Abdo, H., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., Weidmann, S., Rousseaux, S. **Investigation of the capacity of *Brettanomyces bruxellensis* strains to form biofilms.** 11th International Symposium of Enology of Bordeaux, Oeno 2019, Bordeaux, France, 25-28 Juin 2019.

Articles dans des revues internationales à comité de lecture :

Abdo, H., Catacchio, C.R., Ventura, M., D'Addabbo, P., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S. **The establishment of a fungal consortium in a new winery.** *Scientific Reports*, 10, 7962, 2020.

Abdo, H., Catacchio, C.R., Ventura, M., D'Addabbo, P., Calabrese, F.M., Laurent, J., David-Vaizant, V., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S. **Colonization of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains in a new winery.** *Beverages*, 6, 9, 2020.

Lebleux, M., Abdo, H., Coelho, C., Basmacıyan, L., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Roullier-Gall, C., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., Weidmann, S., Rousseaux, S. **New advances on the *Brettanomyces bruxellensis* biofilm mode of life.** *International Journal of Food Microbiology*, 318, 2020.

Introduction générale

Les microorganismes sont omniprésents et jouent un rôle fondamental dans les écosystèmes auxquels ils appartiennent. Dans la filière viti-vinicole, depuis le XIX^{ème} siècle, les travaux pionniers de Louis Pasteur ont ouvert la voie à de nombreux travaux scientifiques visant à caractériser la biodiversité microbienne au cours du processus de vinification mais également au vignoble. Cependant, l'utilisation des méthodes disponibles à cette époque ont uniquement permis d'avoir une vision simplifiée de la biodiversité présente. Il a fallu attendre le milieu du XX^{ème} siècle et le développement des techniques de biologie moléculaire pour approfondir les connaissances quant à la biodiversité microbienne vitivinicole. Plus récemment, au cours du XXI^{ème} siècle, le développement des techniques de séquençage haut débit (NGS) a permis de mettre en évidence des microorganismes faiblement représentés et parfois non détectés par les autres méthodes.

Toutes les techniques développées au fil des années ont été appliquées à la caractérisation de la diversité microbienne depuis le vignoble jusqu'à la mise en bouteille. Ces travaux ont mis en évidence que le consortium microbien au cours du processus de vinification ne se résume pas aux microorganismes présents sur les baies des raisins. En effet, aujourd'hui il est admis que d'autres sources, comme les environnements reliés au vin (nommés WREs : Wine Related Environments) composent ce consortium microbien et que l'environnement d'une cuverie peut-être considérée comme une niche écologique de microorganismes qui peuvent participer à la fermentation alcoolique les millésimes suivants.

La mise en évidence de l'implication de cette flore résidante pose le questionnement de l'établissement d'un consortium microbien dans une nouvelle cuverie. En effet, depuis le début du XXI^{ème} siècle, le nombre de nouvelles constructions vinicoles augmente sans cesse au niveau international et particulièrement en Europe (Bruyas, 2003 ; Eurostat, 2015). Par contre, peu de travaux renseignent sur la biodiversité microbienne et son établissement dans une nouvelle cuverie.

Parallèlement, l'environnement d'une cave d'élevage est également un environnement considéré comme une niche écologique pour certaines populations microbiennes. On peut ainsi admettre que la flore microbienne présente lors de l'élevage des vins peut aussi jouer un rôle dans l'évolution de la composition du vin tout au long du processus de vieillissement. Cependant peu d'études ont été réalisées afin de caractériser cette flore et son implication.

Ainsi, afin d'approfondir nos connaissances sur la biodiversité et l'évolution des populations microbiennes en cuverie et en cave, ce projet de recherche, financé par le Conseil

Régional de Bourgogne-Franche-Comté et par le Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne, a porté sur :

- l'étude, par les techniques NGS, de la biodiversité fongique et son évolution mais aussi son établissement dans une cuverie nouvellement construite et dans trois caves d'élevage.
- l'établissement de corrélations entre les différentes populations présentes et les flores spécifiques étudiées (*Saccharomyces cerevisiae* et *Brettanomyces bruxellensis*).

Ce manuscrit est ainsi structuré en 5 chapitres :

Le premier chapitre présente sous forme d'une étude bibliographique les connaissances actuelles sur (i) les méthodes d'analyse de la biodiversité fongique dans la filière viti-vinicole d'un point de vue global mais aussi au niveau inter- et intraspécifique, (ii) la biodiversité existant dans les environnements reliés au vin, (iii) les mécanismes, facteurs et interactions contribuant à la survie et la persistance de certaines populations fongiques dans ces environnements.

Le second chapitre présente les protocoles d'échantillonnages et les principales méthodes utilisées et analyses réalisées au cours de ce travail.

Le troisième chapitre sera consacré à la caractérisation des populations fongiques d'une nouvelle cuverie présentes au niveau : du sol, des murs, du matériel vinaire avant l'arrivée de la première vendange et ensuite au cours de deux millésimes consécutifs. Cette étude a pour but de comprendre comment s'établit un consortium fongique dans une nouvelle cuverie au cours du temps.

Le quatrième chapitre porte sur la mise en évidence d'une possible colonisation par les levures *Saccharomyces cerevisiae* de la nouvelle cuverie au cours du temps. Les objectifs poursuivis dans ce travail sont tout d'abord d'identifier les souches sauvages présentes dans l'environnement d'une nouvelle cave (sol, murs et équipements) avant l'arrivée de la première récolte, puis de mettre en évidence la colonisation de l'environnement vinicole par des souches isolées dans le pied de cuve réalisé la première année ou isolées de moûts de raisin et de vins lors des deux millésimes consécutifs et enfin de comparer la capacité à former des biofilms des souches "colonisatrices" et des souches présentes ponctuellement.

Le cinquième chapitre porte sur l'étude de la flore microbienne d'intérêt (levures, bactéries lactiques) et d'altération (*Brettanomyces bruxellensis* et bactéries acétiques) de trois

caves d'élevage, pendant deux millésimes et sur différents environnements (sol, murs, matériel, fûts, vins). De plus, la dynamique de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* au cours de l'élevage a également été analysée afin d'établir des corrélations potentielles entre la présence de cette espèce et la biodiversité fongique totale.

Ce manuscrit se termine par une conclusion générale qui reprend les principaux résultats puis une description de perspectives de recherche potentielle.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Partie 1 : Biodiversité microbienne et méthodes d'analyses

1. Biodiversité microbienne : définition et caractérisation

En 1980, Thomas Lovejoy, biologiste américain, spécialiste de l'Amazonie, introduit le terme de *biological diversity*. Ce terme est repris en 1985 par Walter G. Rosen, lors de la préparation du Forum National *Biological diversity* (organisé par le *National Research Council*, 1986) sous *biodiversity*, jugé plus efficace sur le plan de la communication. Le terme *biodiversity* sera publié pour la première fois en 1988 par l'entomologiste américain E.O. Wilson en tant que titre d'un compte rendu de ce forum (Gaultier-Gaillard et Pratlong, 2011). A partir de 1992 (année de la signature de la Convention de Rio sur la biodiversité), l'intérêt pour la biodiversité microbienne s'est développé de manière exponentielle (**Fig. 1**).

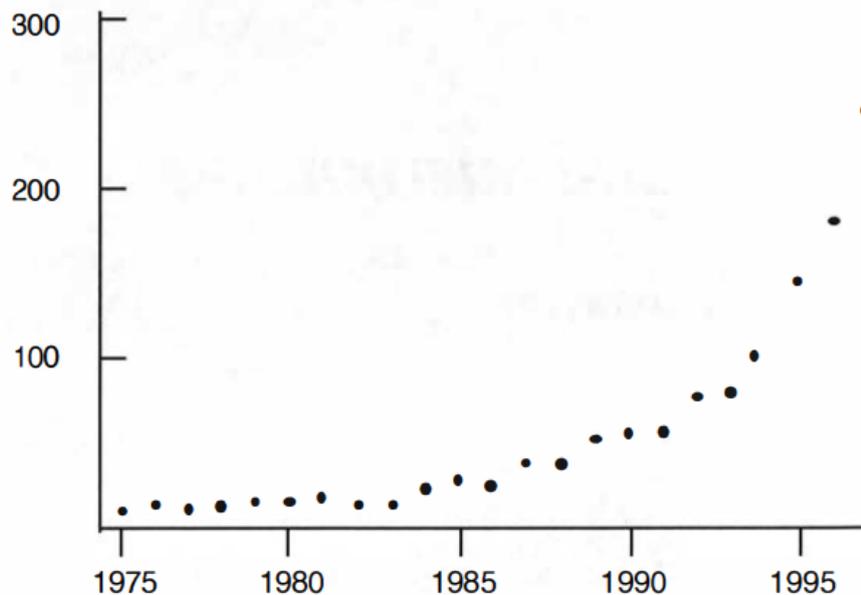


Figure 1 : Evolution du nombre annuel de publications scientifiques traitant de diversité microbienne de 1975 à 1997.

(d'après Balandreau, 2000)

La biodiversité microbienne d'un écosystème donné à un moment donné peut être caractérisée à trois niveaux différents : les diversités α , β et γ (Whittaker, 1972) (**Fig. 2a**), en utilisant des indices de diversité.

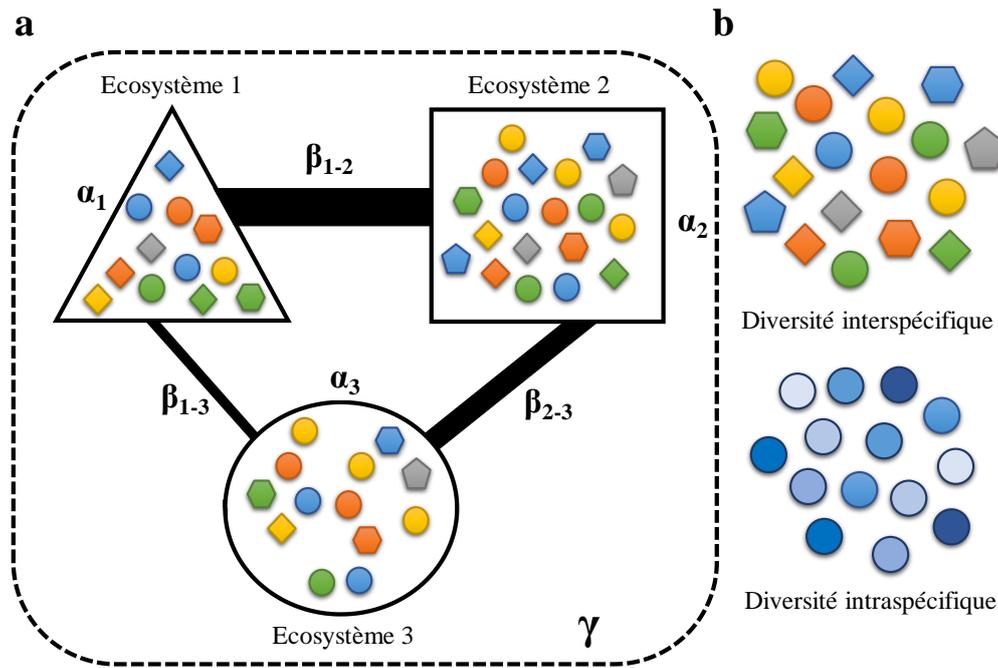


Figure 2 : (a) Présentation des diversités : α (diversité d'un écosystème), β (diversité comparative entre deux écosystèmes) et γ (diversité globale de plusieurs écosystèmes) (b) Illustration des biodiversités interspécifique et intraspécifique.

(d'après Jurasinski *et al.*, 2009)

La mesure de la diversité γ reflète la diversité globale de différents écosystèmes au sein d'une large zone/région (**Fig. 2a**). Cette diversité est définie comme 'la diversité des espèces à l'échelle géographique' (Hunter, 2002). La diversité α , quant à elle, correspond à la diversité au sein d'un écosystème ou d'un compartiment de cet écosystème et est exprimée par le nombre d'espèces (c'est-à-dire la richesse en espèces). Dans la littérature, quatre indices de diversité (Fisher, Margalef, Simpson et Shannon) sont décrits pour mesurer la diversité α (Moreno *et al.*, 2006 ; Thukral, 2017). Les indices de Fisher (Fisher *et al.*, 1943) et de Margalef (Margalef, 1951), prenant en compte uniquement la richesse taxonomique d'un écosystème (Krebs, 1989) sont moins utilisés dans les études de la biodiversité microbienne. Au contraire, les calculs des indices de Simpson (Simpson, 1949) et de Shannon (Shannon and Weaver, 1964) prennent en compte à la fois la richesse et l'abondance relative des espèces présentes au sein d'un écosystème permettant une meilleure estimation de la biodiversité. Ainsi, cette meilleure estimation fait de ces indices les deux indices les plus utilisés dans les études de la biodiversité microbienne.

La diversité β , s'attache à comparer la diversité taxonomique de deux écosystèmes et/ou la diversité d'un même écosystème à deux temps différents. Le calcul de la diversité β est réalisé par (i) la mesure des indices de Jaccard (Jaccard, 1912) et de Sorensen (Sørensen, 1948) suite à une comparaison de la présence/absence des espèces ou (ii) par la mesure des indices de Bray-Curtis (Bray and Curtis, 1957) et l'indice de Czekanowski (Czekanowski, 1909) qui reposent sur la comparaison des abondances relatives des espèces au sein des écosystèmes.

Il est important également de préciser que la biodiversité microbienne peut être évaluée à deux niveaux différents (**Fig. 2b**) :

- la diversité au niveau d'une communauté ou 'biodiversité interspécifique'. Par définition ce niveau de biodiversité désigne la variation des espèces microbiennes entre elles, par leur nombre, leur nature et leur abondance relative. L'intérêt d'étudier la biodiversité interspécifique permet une meilleure compréhension de la complexité microbienne globale d'un écosystème donné.

- la diversité au niveau d'une espèce ou 'biodiversité intraspécifique'. Ce niveau de biodiversité consiste à étudier la variabilité génétique des individus d'une même espèce microbienne. En effet, la variabilité génétique des individus est généralement associée à des différences de fonctionnalités (environnementales, technologiques, ...). Ainsi, la caractérisation intraspécifique d'une espèce microbienne permet, par des analyses postérieures, d'étudier la diversité physiologique et fonctionnelle des différents individus.

Plusieurs méthodes d'analyses sont aujourd'hui disponibles pour étudier la biodiversité inter et intraspécifique. Toutes ces méthodes sont présentées dans le paragraphe ci-dessous.

2. Les méthodes d'analyse de la biodiversité

Le fondement de toutes les méthodes d'analyse de la biodiversité microbienne (inter et intraspécifique) repose sur la classification des microorganismes. En effet, selon l'arbre phylogénétique universel, tous les microorganismes sont classés en trois grands domaines : les « *Bacteria* », les « *Aecheaea* » et les « *Eucarya* » (Woese et Fox, 1977). Chacun de ces domaines est subdivisé en plusieurs niveaux d'identification : règne (R), phylum (P), classe (C), ordre (O), famille (F), genre (G) et espèce (E) (Ainsworth et Cowan, 1954).

Grâce à ces travaux pionniers et à la classification universelle des microorganismes, la biodiversité microbienne peut être étudiée dans des domaines très variés. Les premières études

ont porté sur la biodiversité microbienne des écosystèmes naturels tels que le sol (lithosphère) (Smith, 1942), l'eau (hydrosphère) (ZoBell, 1946) et l'air (atmosphère) (Gregory, 1971) puis les travaux ont porté sur la biodiversité microbienne de matrices alimentaires comme par exemple le moût de raisin et le vin (Fleet et Heard, 1993 ; Mortimer et Polsinelli, 1999).

2.1 Les méthodes d'analyse de la biodiversité dans la filière viti-vinicole

A l'échelle de la filière viti-vinicole, plusieurs méthodes d'analyse de biodiversité ont été développées au fil des années.

Le choix de la méthode d'analyse la plus adéquate dépend du niveau de biodiversité microbienne souhaité : interspécifique pour avoir une vue globale des communautés présentes ou intraspécifique pour la caractérisation d'une population particulière (microorganismes d'intérêt ou d'altération). Ensuite, le choix de la technique d'analyse sera fonction des avantages et des inconvénients de la méthode elle-même (étape de culture ou non, technique moléculaire ou non). Les différentes caractéristiques des techniques d'analyse sont présentées dans le **tableau 1**.

2.1.1 Biodiversité intraspécifique et méthodes culture-dépendante associées

L'importance d'étudier la biodiversité intraspécifique dans la filière viti-vinicole réside dans la fonctionnalité des microorganismes isolés. Principalement, la diversité intraspécifique a été étudiée au niveau de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* ou de certaines espèces non-*Saccharomyces* d'intérêt œnologique. En effet, différentes caractéristiques fermentaires telles que la production de composés aromatiques d'intérêt sont fonction des souches de *S. cerevisiae* étudiées et/ou de certaines souches de non-*Saccharomyces* (Howell *et al.*, 2004 ; Sadoudi *et al.*, 2012). De plus, l'étude de la diversité intraspécifique de levures d'altération, comme l'espèce *Brettanomyces bruxellensis*, a permis de mettre en évidence que certains paramètres physiologiques (exemples : besoins nutritionnels et résistance au SO₂) sont souche dépendante (Longin *et al.*, 2016 ; Avramova *et al.*, 2018b ; Cibrario *et al.*, 2019a).

Dans un premier temps afin d'avoir accès aux microorganismes à étudier, il est nécessaire de cultiver les microorganismes à étudier sur des milieux de culture sélectifs. A titre d'exemple, le milieu ITV a été mis au point par Gerbaux *et al.* (2000) pour l'isolement de l'espèce *B. bruxellensis*. Cependant, le temps de génération élevé de cette espèce exige un temps d'incubation très long qui peut atteindre une semaine.

Tableau 1 : Méthodes d'analyse de la biodiversité microbienne utilisées dans la filière viti-vinicole.

Type de biodiversité	Méthode d'analyse	Méthode culture dépendante	Méthode moléculaire	Niveau d'identification							Référence
				Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce	Souche	
Biodiversité intraspécifique	IR-TF	Oui	Non								Fellgett, 1951
	MADI-TOF-MS										Holland <i>et al.</i> , 1996
	RAPD	Oui	Oui								Williams <i>et al.</i> , 1990
	PCR-Interdelta										Ness <i>et al.</i> , 1993 - Legras et Karst, 2003
	Microsatellites										Field et Wills, 1998
	MSP-PCR										Lieckfeldt <i>et al.</i> , 1993
	ERIC-PCR										Sharples et Lloyd, 1990
	ISS-PCR										de Barros Lopes <i>et al.</i> , 1996
mt-RFLP										Dubourdieu <i>et al.</i> , 1987	
Carotyptpage								Carle et Olson, 1985			
Biodiversité intra ou interspécifique	AFLP	Oui	Oui								Vos <i>et al.</i> , 1995
Biodiversité interspécifique	RFLP	Oui	Oui								Guillamón <i>et al.</i> , 1998
	REP-PCR										Stern <i>et al.</i> , 1984
	T-RFLP	Non	Oui								Liu <i>et al.</i> , 1997
	RISA										Fisher et Triplett, 1999
	DGGE										Fischer et Lerman, 1983
	CE-SSCP										Schwieger et Tebbe, 1998
	454-Pyroséquençage										Margulies <i>et al.</i> , 2005
	Séquençage Illumina ciblé										Fedurco <i>et al.</i> , 2006 - Turcatti <i>et al.</i> , 2008
Séquençage Illumina WGS										Fedurco <i>et al.</i> , 2006 - Turcatti <i>et al.</i> , 2008	

 Niveau d'identification indépendant du microorganisme en question  Niveau d'identification dépendant du microorganisme en question

----- Niveau d'identification déductif après analyse

Après dénombrement sur milieu sélectif et isolement des colonies développées, plusieurs méthodes de caractérisation de la biodiversité intraspécifique sont disponibles dans la littérature : on peut distinguer des méthodes non-moléculaires et des méthodes moléculaires.

2.1.1.1. Les méthodes non-moléculaires

Les deux techniques non-moléculaires les plus utilisées sont la spectrométrie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IR-TF) et la spectrométrie de masse (MS) couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI) et un analyseur à temps de vol (TOF). Ces techniques permettent l'identification de microorganismes en fonction de paramètres métaboliques et biochimiques.

Le principe de la technique IR-TF est fondé sur la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques suite à une irradiation par une lumière infra-rouge (Naumann *et al.*, 1991). L'absorption des différents composants cellulaires (acides gras, protéines, peptides, glucides et composés phosphatés) génère un spectre unique qui ensuite sera comparé avec une base de données. La dissimilarité entre les spectres est exprimée par la valeur de distance spectrale (SD) qui reflète les zones non chevauchantes des spectres (Wenning *et al.*, 2002). Cette comparaison permet donc l'identification au niveau du genre, de l'espèce ou de la souche en fonction du microorganisme étudié et de la richesse des bases de données. Etant donné que la composition des parois des microorganismes est très dépendante des conditions de culture, il est souvent nécessaire de créer des bases de données propres à chaque laboratoire si les conditions de culture sont différentes. Cependant, pour une identification intraspécifique, ce problème est affranchi puisque les spectres sont comparés entre eux. Par cette technique, différentes espèces levuriennes d'intérêt comme *S. cerevisiae* (Adt *et al.*, 2010), *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Starmerella bacillaris* (Grangeteau *et al.*, 2016a, 2016b) ainsi que la levure d'altération *B. bruxellensis* (Oelofse *et al.*, 2010) ont été étudiées.

Le principe de la technique MALDI-TOF-MS repose sur l'obtention de signatures spectrales correspondantes à la composition protéique des parois cellulaires suite à l'exposition des cellules à une source laser (Holland *et al.*, 1996). Cette technique est largement employée, en partie à cause de la simplicité de préparation des échantillons et la rapidité avec laquelle les données peuvent être acquises et analysées. Hormis les applications médicales (Croxatto *et al.*, 2012), cette technique MALDI-TOF-MS a également été utilisée pour l'identification de souches de levures *S. cerevisiae* au cours du processus de vinification (Usbeck *et al.*, 2014 ;

Kántor et Kacaniova, 2015). Bien que le succès de discrimination au niveau du genre et de l'espèce ait été mis en évidence, la discrimination au niveau de la souche s'est révélée plus difficile à obtenir pour certaines espèces. En effet, pour des espèces de levures non-*Saccharomyces* (*Cryptococcus amyloletus*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Hanseniaspora osmophila*, *H. uvarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Lachancea thermotolerans*, *Torulaspora delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus* et *Zygosaccharomyces bailii*), cette technique n'a pas permis une discrimination au niveau de la souche (Gutiérrez *et al.*, 2017).

2.1.1.2. Les méthodes moléculaires

Au cours des deux dernières décennies et suite à la découverte de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (Mullis *et al.*, 1986), des méthodes d'analyse moléculaire ont été développées pour identifier les microorganismes au niveau de la souche. L'identification par ces méthodes est basée sur l'obtention d'empreintes moléculaires permettant une identification plus fiable et reproductible par rapport aux méthodes non-moléculaires.

Huit techniques moléculaires ont été appliquées à l'étude de la diversité intraspécifique dans la filière viti-vinicole : la RAPD-PCR, la PCR-Interdelta, les marqueurs microsatellites, la MSP-PCR, l'ERIC-PCR, l'ISS-PCR, la mt-RFLP et le caryotypage (Ivey et Phister, 2011).

La technique RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA) repose (i) sur l'utilisation d'une seule amorce et (ii) la conduite la réaction PCR à basse température d'hybridation (Williams *et al.*, 1990). Ces conditions particulières permettent de multiples hybridations aléatoires au niveau du génome et ainsi d'obtenir des empreintes uniques permettant la discrimination au niveau de la souche. Malgré sa rapidité de traitement des données et sa capacité à classer un grand nombre de souches, la RADP-PCR présente quelques inconvénients. En effet, au cours de la réaction PCR, l'hybridation aléatoire des amorces peut mener à l'obtention de différentes empreintes moléculaires pour une même souche. De plus, des variations dans l'extraction de l'ADN ou même le type de thermocycleur peuvent affecter la reproductibilité de cette technique. La RAPD-PCR a été utilisée pour étudier la diversité génétique de l'espèce *S. cerevisiae* (Torriani *et al.*, 1999 ; Xufre *et al.*, 2000) et pour suivre l'implantation de différentes souches au cours de la fermentation alcoolique (FA) (Urso *et al.*, 2008). Cette technique a également été utilisée pour analyser la diversité génétique de la levure d'altération *B. bruxellensis* (Agnolucci *et al.*, 2009).

La PCR-Interdelta a été développée pour étudier la diversité intraspécifique de l'espèce *S. cerevisiae* (**Fig. 3**). En effet, au sein du génome de l'espèce *S. cerevisiae*, un grand nombre

de séquences répétées LTR (Long Terminal Repeat) sont présentes dont les rétrotransposons Ty. Les LTR les plus abondants (~250 copies) sont les éléments delta (ciblés par cette technique) relatifs aux rétrotransposons Ty1 et Ty2 (Kim *et al.*, 1998). Cette méthode a premièrement été décrite par Ness *et al.*, (1993) en utilisant les amorces $\Delta 1$ et $\Delta 2$ sur un panel de 17 souches différentes de *S. cerevisiae*. Cependant, par alignements de ces amorces sur le génome de *S. cerevisiae*, Legras et Karst (2003) ont démontré une très faible homologie principalement pour l'amorce $\Delta 1$. A cet égard, les amorces $\Delta 12$ et $\Delta 21$ ont été proposées pour l'optimisation de cette technique et une meilleure discrimination a été obtenue. Depuis la proposition de ces nouvelles amorces, plusieurs études ont été menées dans le but d'étudier la diversité intraspécifique de différentes souches de *S. cerevisiae* et de suivre leur l'implantation au cours de la FA (Xufre *et al.*, 2011 ; Šuranská *et al.*, 2016 ; Tra Bi *et al.*, 2016 ; David-Vaizant et Alexandre, 2018). En comparaison avec les autres méthodes moléculaires, la PCR-Interdelta est la méthode la plus utilisée grâce à sa rapidité, sa reproductibilité et sa haute sensibilité (Schuller *et al.*, 2004).

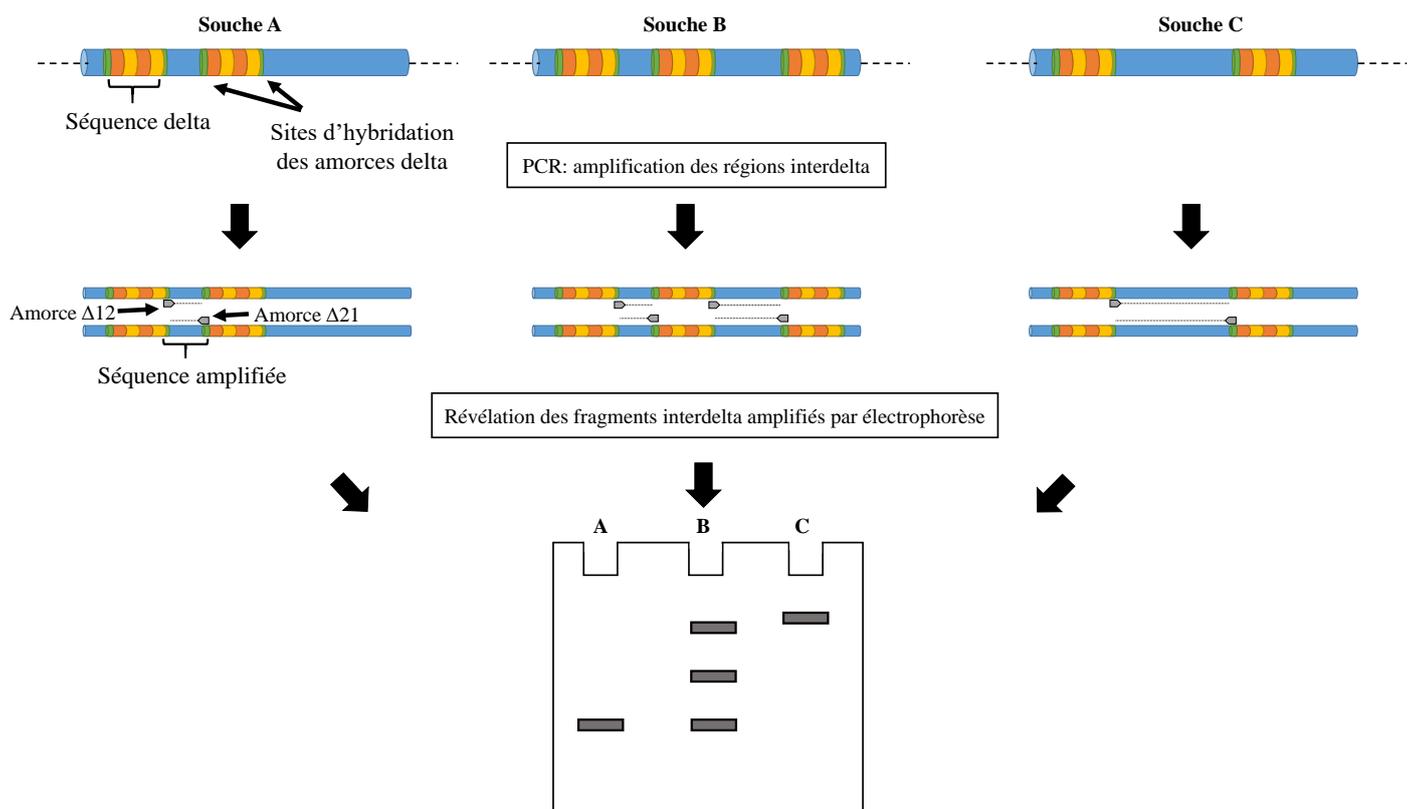


Figure 3 : Illustration du principe de la PCR-Interdelta utilisée pour étudier la diversité intraspécifique de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

(source personnelle)

A la différence de la PCR-Interdelta qui vise des éléments delta insérés de manière aléatoire dans le génome, l'analyse microsatellites amplifie des sites spécifiques du génome qui contiennent des motifs répétés en tandem le plus souvent de 2 ou 3 nucléotides (mais pouvant aller jusqu'à 10 bases). A la différence de la PCR-Interdelta, le polymorphisme ne porte pas sur le site d'insertion mais sur le nombre de répétitions du motif. La puissance des marqueurs microsatellites réside dans: (i) leur haute reproductibilité, (ii) leur dispersion sur le génome des sites retenus, (iii) leur détection à différents états de ploïdies, (iv) la spécificité aux individus d'une même espèce et (v) leur amplification avec une faible quantité d'ADN (Hodel *et al.*, 2016). Les marqueurs microsatellites ont été développés pour le typage de plusieurs espèces œnologiques ou d'altération : *S. cerevisiae* (Hennequin *et al.*, 2001 ; Pérez *et al.*, 2001), *B. bruxellensis* (Albertin *et al.*, 2014a ; Avramova *et al.*, 2018a), *L. thermotolerans* (Hranilovic *et al.*, 2017), *Starmerella bacillaris* (Masneuf-Pomarede *et al.*, 2015), *T. delbrueckii* (Albertin *et al.*, 2014b). De plus, le suivi de la dynamique de différentes souches de *S. cerevisiae* au cours de la FA a été réalisée en utilisant cette technique (Howell *et al.*, 2004).

De la même manière que les microsatellites, les minisatellites sont des régions répétées, mais de plus grande taille (10-100 bases) et le polymorphisme du nombre de répétitions peut être utilisé également pour différencier des souches, plus particulièrement de l'espèce *S. cerevisiae* (Marinangeli *et al.*, 2004 ; Carvalho-Netto *et al.*, 2013).

L'ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) et l'ISS-PCR (Intron Splice Site) sont également des techniques ciblant des séquences répétées au niveau du génome des microorganismes. La technique ERIC-PCR a été décrite comme un outil performant pour la discrimination de souches de bactéries lactiques et acétiques au cours du processus de fermentation (González *et al.*, 2004 ; González *et al.*, 2005). A l'heure actuelle étant donné le faible nombre d'études existantes pour la discrimination intraspécifique des levures (de Barros Lopes *et al.*, 1996 ; Hierro *et al.*, 2004), la fiabilité de ces deux méthodes n'est encore pas reconnue.

Parmi les méthodes de discrimination intraspécifique moléculaire, certaines ne nécessitent pas d'étape d'amplification : c'est le cas de la technique mt-RFLP (Mitochondrial DNA Restriction Fragment Length Polymorphism) et de la technique de caryotypage. Pour ces techniques, l'obtention d'empreintes moléculaires permettant la discrimination au niveau de la souche se base soit sur la variabilité de l'ADN mitochondrial suite à une digestion enzymatique (Dubourdieu *et al.* 1987) soit sur la variabilité de tailles et formes des chromosomes (Carle et

Olson, 1985). La technique mt-RFLP, a permis une discrimination intraspécifique au sein de certaines espèces *Saccharomyces* (Vezinhet *et al.*, 1990 ; Querol *et al.*, 1992 ; Sabate *et al.*, 2002 ; Maio *et al.*, 2012) et non-*Saccharomyces* (*B. bruxellensis*, *Candida stellata*, *H. uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia guilliermondii* et *T. delbrueckii*) (Pramateftaki *et al.*, 2000 ; Martorell *et al.*, 2006) en raison du fort taux de polymorphisme de l'ADN mitochondrial. Pour la technique du caryotypage, cette méthode a été utilisée pour le typage de souches de *S. cerevisiae*, *H. uvarum*, *M. pulcherrima*, *Yarrowia lypolitica* et *Schizosaccharomyces pombe* (Bidenne *et al.*, 1992 ; Schütz et Gafner, 1993 ; Guillamón *et al.*, 1996 ; Zimmermann et Fournier, 1996). Cependant, cette méthode est laborieuse, difficile à mettre en œuvre et nécessite un temps de manipulation considérablement long (Boekhout *et al.*, 1993).

2.1.2. Biodiversité inter ou intraspécifique et méthode associée

L'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) est une méthode moléculaire capable d'identifier les microorganismes non seulement au niveau interspécifique mais également au niveau intraspécifique (Vos *et al.*, 1995). Le principe de cette méthode se base sur la digestion enzymatique du génome des microorganismes étudiés suivie de l'amplification sélective des fragments de restriction obtenus. Au niveau interspécifique, l'AFLP a été utilisée pour identifier différentes espèces du genre *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces carlsbergensis* et *Saccharomyces paradoxus*) (Azumi et Goto-Yamamoto, 2001). De plus, cette méthode permet la discrimination de différentes souches au sein de l'espèce *S. cerevisiae* (Azumi et Goto-Yamamoto 2001 ; Lopandic *et al.*, 2007), ainsi que l'espèce *B. bruxellensis* (Curtin *et al.*, 2007). Bien que fiable, l'AFLP est une technique laborieuse, longue et nécessite l'utilisation d'analyseurs d'électrophorèse automatisés, ce qui la rend coûteuse et moins utilisée dans le domaine viti-vinicole.

La MSP-PCR (Microsatellite/minisatellite Primed) est une méthode basée sur l'amplification de régions du génome à l'aide de séquences « microsatellites ou minisatellites », comme par exemple le primer (GTG)₅. A l'inverse des analyses de microsatellites ou de minisatellites, cette méthode analyse les régions localisées entre les cibles d'hybridation (Lieckfeldt *et al.*, 1993), tout comme la PCR-Interdelta. Comme les motifs microsatellites sont très répandus dans les génomes des différentes espèces de levures, cette méthode permet de révéler un polymorphisme au niveau inter et intraspécifique. En effet, cette méthode a montré des niveaux de discrimination inter et intraspécifique très élevés pour les espèces

B. bruxellensis, *Pichia manshuria*, *Pichia membranifaciens*, *T. delbrueckii*, *S. cerevisiae* et *Z. bailii* (Ramírez-Castrillón *et al.*, 2014).

2.1.3. Biodiversité interspécifique et méthodes associées

L'étude de la diversité interspécifique permet (i) d'avoir une vue d'ensemble de toutes les populations cultivables ou totales présentes dans un échantillon, (ii) d'étudier l'évolution et la dynamique de ces populations au cours du temps et (iii) de voir si des liens existent entre les populations totales et des populations spécifiques (d'intérêt ou d'altération). L'accès à la diversité interspécifique d'un échantillon peut être réalisé par des méthodes culture-dépendante ou culture-indépendante.

2.1.3.1. Les méthodes culture-dépendante

Pour ces techniques, une étape de culture sur un milieu nutritif doit être réalisée ce qui permet également de quantifier les microorganismes cultivables présents dans l'échantillon à analyser. Nous pouvons citer des exemples de milieux régulièrement utilisés [levures totales : YPD (Yeast Peptone Dextrose), ESA (Ethanol Sulfite Agar) (Kish *et al.*, 1983 ; Heard et Fleet, 1986) ; levures non-*Saccharomyces* : milieu Lysine agar (Heard et Fleet, 1986) ; bactéries lactiques : milieu MRS (deMan, Rogosa, Sharpe) (de Man *et al.*, 1960), milieu Lac (Bae *et al.*, 2006 ; Simonin *et al.*, 2018) ; bactéries acétiques : milieu GYC (Glucose Yeast Calcium carbonate), milieu Mannitol (du Toit et Lambrechts, 2002)]. Cette étape est chronophage en raison de longues périodes d'incubation.

D'autres méthodes peuvent être utilisées pour quantifier les microorganismes présents dans un échantillon, telles que la cytométrie en flux (Malacrino *et al.*, 2001) ou les techniques RT-q-PCR (Real Time quantitative-PCR) (Hierro *et al.*, 2006) et Cells q-PCR (quantitative-PCR) (Soares-Santos *et al.*, 2018) utilisant des amorces universelles ciblant la région D1/D2 du gène 26S rDNA. Cependant, par rapport aux milieux de culture, ces techniques nécessitent l'acquisition de matériel et une certaine technicité.

Parmi les méthodes culture-dépendante, la méthode PCR ITS-RFLP (Internal Transcribed Spacer - Restriction Fragment Length Polymorphism) est la méthode la plus décrite pour l'identification interspécifique des microorganismes. Le principe de cette méthode se base sur l'amplification de la région ITS composée de séquences conservées à tous les microorganismes permettant une amplification universelle et de séquences variables permettant la discrimination interspécifique. Grâce à une étape de restriction enzymatique du fragment amplifié, des profils de restriction spécifiques sont obtenus qui, comparés avec les profils de

restriction disponibles dans les bases de données, permettent la discrimination. Cette technique a été couramment utilisée pour l'identification des levures au cours du processus de vinification (Guillamón *et al.*, 1998 ; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999 ; Granchi *et al.*, 1999 ; Sabate *et al.*, 2002 ; Nisiotou *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2015 ; Simonin *et al.*, 2018). Elle a également été décrite comme outil puissant pour la discrimination de moisissures et champignons isolés des baies de raisin (Bau *et al.*, 2006 ; Martínez-Culebras et Ramón, 2007 ; Diguta *et al.*, 2011 ; Spadaro *et al.*, 2012 ; Kizis *et al.*, 2014). Cette technique présente l'avantage d'être un outil moléculaire simple et précis pour l'identification des microorganismes. Toutefois, le coût élevé associé à l'utilisation de plusieurs enzymes peut être un inconvénient de cette technique. En effet, l'emploi de quatre différentes enzymes de restriction est souvent nécessaire pour une identification fiable notamment entre différentes espèces d'un même genre (*H. guilliermondii*, *H. osmophila*, *H. uvarum* et *Hanseniaspora valbyensis*) (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

La méthode PCR RFLP a également été utilisée pour identifier les levures œnologiques mais en ciblant la région 26S de l'ADN ribosomique (ADNr) (Baleiras Couto *et al.*, 2005 ; Zanol *et al.*, 2010). Cependant, cette cible ou région est moins utilisée due à la plus faible variabilité entre espèces et donc au faible taux de discrimination. En effet, Zanol *et al.* (2010) montrent que même avec l'utilisation de cinq enzymes de restriction cette technique n'est pas dans la mesure de discriminer les espèces *H. guilliermondii* et *H. uvarum*.

La technique REP PCR (Repetitive Element Sequence-based PCR) est une technique ciblant les fragments d'ADN palindromiques répétitifs extra géniques qui sont variables d'une espèce à l'autre (Stern *et al.*, 1984). Par rapport à la technique PCR ITS-RFLP, la REP-PCR est moins utilisée pour l'identification des levures due à sa faible reproductibilité. En effet, en analysant la diversité interspécifique des genres œnologiques *Candida*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Issatchenkia*, *Saccharomycodes*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* et *Zygosaccharomyces*, Hierro *et al.* (2004) démontrent que des précautions doivent être prises afin d'éviter des amplifications non spécifiques et des résultats non exploitables.

2.1.3.2. Les méthodes culture-indépendante

Afin de s'affranchir des longues périodes d'incubation liées à l'étape de culture, des méthodes culture-indépendante ont été développées au fil des années. En plus de la rapidité d'analyse, l'analyse de la biodiversité par ces méthodes permet l'accès à la fraction non-cultivable des microorganismes (Díaz *et al.*, 2018). Cette fraction non-cultivable concerne des microorganismes soit (i) dans un état viable mais non cultivable (VNC), soit (ii) dans

l'incapacité de se développer sur le milieu de culture sélectionné. La première étape commune à toutes les techniques culture-indépendante est l'extraction d'ADN.

2.1.3.2.1. L'extraction d'ADN

L'utilisation des techniques culture-indépendante requièrent une extraction d'ADN de haute qualité qui est toujours un défi dans le domaine viti-vinicole. En effet, les échantillons à analyser peuvent avoir pour origine les sols viticoles, le matériel végétal (racines, ceps et feuilles), le moût et/ou le vin, et ainsi contenir des molécules rendant l'extraction d'ADN difficile (polyphénols, polysaccharides, acides humiques, acides fulviques et ions métalliques) ou inhibant plus tard la réaction d'amplification (Briciu *et al.*, 2010). Afin de s'affranchir de ces problèmes, des composés comme le NaCl, la polyvinylpyrrolidone (PVP), le sérum albumine bovine (BSA) et la T4 Gene 32 protéine peuvent être utilisés au cours de l'extraction de l'ADN (Kreader, 1996 ; Porebski *et al.*, 1997 ; Gindreau *et al.*, 2001). De plus, une étape de purification est souvent réalisée afin d'améliorer la qualité de l'ADN. Cependant, cette étape de purification peut être à l'origine de perte d'une partie de l'ADN extrait. Ainsi, en fonction de l'échantillon, plusieurs protocoles d'extraction d'ADN ont été développés en se basant sur différentes approches telles que la lyse par congélation-décongélation (Işçi *et al.*, 2014), par broyage à l'azote liquide (Lodhi *et al.*, 1994) ou par utilisation de billes de verre (Divol et Lonvaud-Funel, 2005). La majorité des protocoles d'extraction d'ADN implique l'utilisation de solvants organiques (phénol/chloroforme, bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB), ...) pour l'élimination des protéines. Ces composés sont décrits pour avoir un effet inhibiteur surtout au niveau de l'étape d'amplification de la PCR (Steenkamp *et al.*, 1994) ce qui rend cette étape d'élimination des protéines critique. Ainsi, le choix d'un protocole d'extraction d'ADN bien adapté est une étape déterminante pour éviter les biais liés à une sur ou sous-estimation des populations présentes. En effet, une grande variabilité de quantité et de qualité de l'ADN extrait peut-être obtenue selon la méthode retenue et utilisée (Baleiras-Couto et Eiras-Dias, 2006 ; Pereira *et al.*, 2011 ; Işçi *et al.*, 2014).

2.1.3.2.2. Les méthodes moléculaires

A ce jour, quatre méthodes moléculaires sont décrites pour analyser la diversité interspécifique dans la filière viti-vinicole sans étape de culture : la T-RFLP, la RISA, la CE-SSCP et la PCR-DGGE.

Concernant les techniques T-RFLP (Terminal - Restriction Fragment Length Polymorphism) (Liu *et al.*, 1997) et RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) (Fisher et

Triplett, 1999), leur principe repose sur l'étude de la variabilité taxonomique d'une séquence d'ADN cible. Cependant, pour la technique T-RFLP il s'agit du polymorphisme de séquence révélé par un changement de conformation ou un changement de taille suivant la cible considérée alors que pour la technique RISA il s'agit de la variabilité de taille des espaces inter-transcrits (ITS) ou des espaces inter-géniques (IGS) correspondant aux espaces externes (ETS) transcrits et aux régions non-transcrites (NTS) de l'ADN ribosomique. Ces deux méthodes impliquent l'utilisation d'amorces couplées à une molécule fluorescente permettant la détection et la quantification des fragments obtenus. La précision et la fiabilité de ces méthodes est dépendante du niveau de variabilité de la séquence d'ADN amplifiée. En effet quelle que soit la méthode utilisée, les études démontrent que pour une même espèce des fragments de tailles différentes peuvent être obtenus (Avis *et al.*, 2006). Dans la filière viti-vinicole, ces méthodes ont été utilisées pour étudier la diversité des communautés fongiques sur la vigne (Pancher *et al.*, 2012) et le suivi des communautés levuriennes et bactériennes pendant la FA (Bokulich *et al.*, 2012a ; Sun et Liu, 2014 ; Ghosh *et al.*, 2015 ; Bagheri *et al.*, 2017).

La CE-SSCP (Capillary Electrophoresis - Single-Strand Conformational Polymorphisms), quant à elle, est une technique basée sur la séparation des fragments d'ADN simple brin de même longueur en fonction de leur séquence. Cette méthode a été utilisée pour le suivi des populations levuriennes (Schmid *et al.*, 2011a ; Martins *et al.*, 2014) et bactériennes (Grube *et al.*, 2011) présentes sur la vigne et des population levuriennes au cours de la FA (Duarte et Baleiras-Couto, 2012).

La technique PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), est la technique la plus utilisée pour étudier la diversité interspécifique. Cette technique s'appuie sur la séparation de fragments d'ADN de différentes séquences nucléotidiques en fonction de leur mobilité électrophorétique sur un gel de polyacrylamide contenant un gradient linéaire dénaturant (formamide, urée, ou mélange des deux composés) (Fischer et Lerman 1983). La vitesse de dénaturation des fragments d'ADN est également fonction du pourcentage de GC trouvé dans la séquence (bases liées par 3 liaisons hydrogène). Ainsi, pour éviter une dénaturation totale des séquences et leur élution du gel, l'amplification par PCR est réalisée avec une queue GC (GC clamp) attachée à l'extrémité 5' des amorces (Myers *et al.*, 1985). Après séparation, les séquences recherchées sont excisées directement du gel et séquencées pour l'identification des espèces levuriennes. La PCR-DGGE a été employée pour l'analyse de la diversité levurienne sur les baies de raisin (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004 ; David *et al.*, 2014) et au cours de la FA (Cocolin *et al.*, 2000, 2001) ainsi que la diversité des bactéries lactiques

au cours de la fermentation malolactique (Renouf *et al.*, 2007). La PCR-DGGE présente plusieurs avantages dont la possibilité d'identifier des levures viables mais non cultivables. Cette technique hautement sensible est capable de détecter des espèces de levures dans le vin qui représentent moins de 0,01 % de la population totale (Cocolin *et al.*, 2000, 2001 ; Prakitchaiwattana *et al.*, 2004) et qui sont généralement non-déTECTABLES par les méthodes culturales.

Ces 4 techniques culture-indépendante (T-RFLP, RISA, CE-SSCP et PCR-DGGE) utilisent de l'ADN amplifié qui peut être issu de cellules vivantes ainsi que de cellules mortes. Pour pallier à ce problème, l'utilisation du bromure d'éthidium monoazide (EMA) est une solution suggérée par Rudi *et al.* (2005). En effet, l'EMA est un marqueur fluorescent qui peut traverser la membrane des cellules mortes et donc se lier à l'ADN et empêcher son amplification.

2.1.3.2.3. Les méthodes NGS (Next Generation Sequencing)

Le séquençage Sanger, classé comme technique de séquençage de première génération, est basé sur l'utilisation des analogues chimiques (groupe 3' hydroxyl nécessaire à l'extension) des désoxyribonucléotides (dNTPs) qui sont les monomères des brins d'ADN (Sanger *et al.*, 1977). Le mélange des dNTPs dans une réaction d'extension d'ADN produit des brins d'ADN de toutes les longueurs possibles. Ainsi, en effectuant quatre réactions d'extensions parallèles contenant chacune une seule base dNTP, la séquence nucléotidique peut être obtenue. La précision et la robustesse de cette technique ont fait du séquençage Sanger la technologie la plus couramment utilisée pour séquencer l'ADN pendant les trois dernières décennies. Cependant, cette méthode est extrêmement coûteuse et il est difficile d'améliorer sa vitesse ce qui limite son utilisation pour le séquençage de génomes complexes ou d'un grand nombre de séquences (Kulski *et al.*, 2016).

L'apparition des techniques NGS a permis de pallier aux limites du séquençage Sanger grâce à leur rapidité et leur faible coût. En dehors de leur utilisation pour séquencer l'ensemble du génome de microorganismes, les techniques NGS ont été adaptées pour le séquençage d'amplicons, ou en d'autres termes, des produits d'amplification PCR. En ciblant le gène codant pour l'ARNr, les techniques de séquençage d'amplicons génèrent plusieurs millions de séquences courtes à un débit très élevé. De plus, la puissance analytique des techniques NGS permet, à partir d'un échantillon donné, d'obtenir un taux de recouvrement élevé de toutes les populations présentes. De plus, l'utilisation des techniques NGS a permis d'accéder à des

microorganismes faiblement représentés parfois non détectés par toutes les autres techniques (De Mandal *et al.*, 2015).

Dans la filière viti-vinicole, l'application des techniques NGS a débuté en 2011 et ne cesse de se développer (**Fig. 4**).

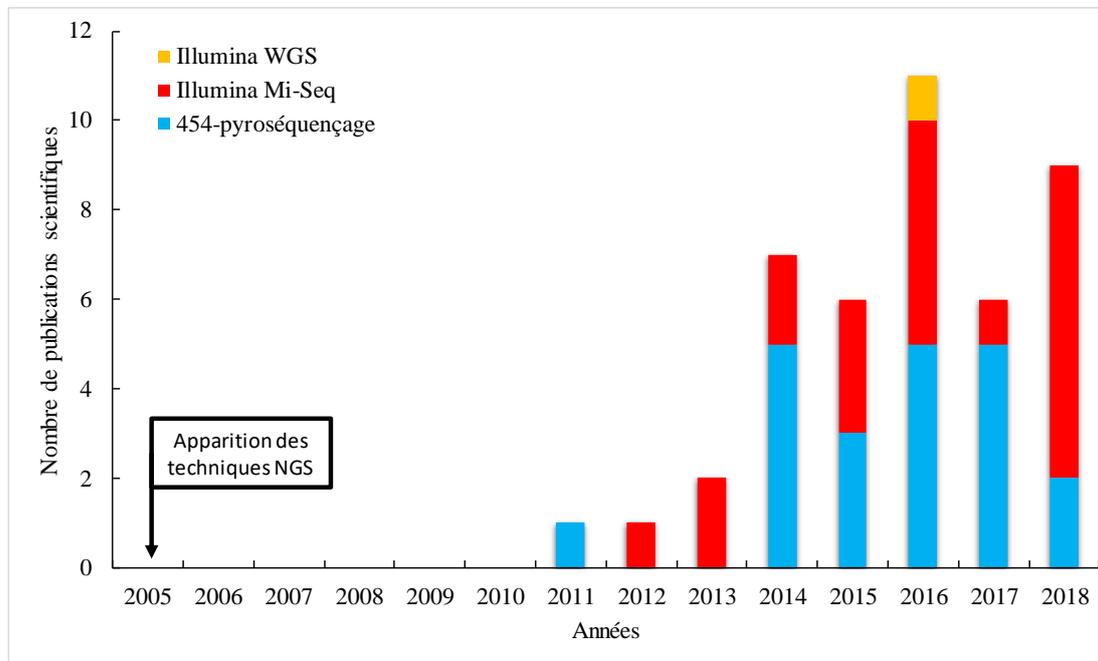


Figure 4 : Evolution du nombre annuel de publications scientifiques utilisant des techniques de séquençage de nouvelle génération (NGS) pour étudier la biodiversité microbienne dans la filière viti-vinicole.

(source personnelle)

Par ces techniques NGS, l'accès à une biodiversité plus importante a pu être mise en évidence (Belda *et al.*, 2017 ; Morgan *et al.*, 2017 ; Kioroglou *et al.*, 2018 ; Stefanini et Cavalieri 2018 ; Vitulo *et al.*, 2019). En effet, 12 genres levuriens, 219 genres bactériens et 81 genres de moisissures et champignons ont été nouvellement décrits dans la filière viti-vinicole par les techniques NGS (**Tableau 2**).

Bien qu'offrant des avantages liés à l'analyse d'un nombre important d'échantillons et à l'accès à une plus grande diversité, les techniques NGS présentent certaines limites. Outre les biais liés à l'étape d'extraction d'ADN (abordés dans le paragraphe 2.1.3.2.1), l'amplification réalisée par des amorces indexées (uniquement pour les techniques NGS) est une étape au cours de laquelle des biais supplémentaires sont introduits (Soergel *et al.*, 2012). En effet, comme toute technique basée sur une étape d'amplification par PCR, la représentativité des communautés microbiennes dans un échantillon peut être mal estimée, en raison d'une incompatibilité ou d'une mauvaise hybridation des amorces (Hong *et al.*, 2009 ; Lee *et al.*, 2012).

Tableau 2 : Liste des genres de levures, bactéries, moisissures et champignons identifiés par les techniques non-NGS et NGS dans la filière viti-vinicole.

	Genres identifiés par les techniques non-NGS et NGS	Genres identifiés uniquement par les techniques NGS	
Levures	<i>Aureobasidium</i> <i>Brettanomyces</i> <i>Bulleromyces</i> <i>Candida</i> <i>Citeromyces</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Curvibasidium</i> <i>Cystobasidium</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Dekkera</i> <i>Filobasidium</i> <i>Hanseniaspora</i> <i>Hyphopichia</i> <i>Issatchenkia</i> <i>Kabatiella</i> <i>Kazachstania</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Lachancea</i> <i>Lipomyces</i> <i>Metschnikowia</i> <i>Meyerozyma</i>	<i>Millerozyma</i> <i>Naganishia</i> <i>Nakazawaea</i> <i>Pichia</i> <i>Pseudozyma</i> <i>Rhodosporidium</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Saccharomycodes</i> <i>Schizosaccharomyces</i> <i>Sporidiobolus</i> <i>Sporobolomyces</i> <i>Starmerella</i> <i>Torulaspora</i> <i>Tremella</i> <i>Vishniacozyma</i> <i>Wickerhamomyces</i> <i>Yarrowia</i> <i>Zygoascus</i> <i>Zygosaccharomyces</i> <i>Zygorulasporea</i>	<i>Arthroascus</i> <i>Bandoniozyma</i> <i>Bullera</i> <i>Curvibasidium</i> <i>Dioszegia</i> <i>Gigaspora</i> <i>Kurtzmanomyces</i> <i>Lalaria</i> <i>Naganishia</i> <i>Rhodosporidiobolus</i> <i>Taphrina</i>
Moisissures et Champignons	<i>Acremonium</i> <i>Actinomyces</i> <i>Alternaria</i> <i>Arthrinium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Beauveria</i> <i>Botrytis</i> <i>Cadophora</i> <i>Chaetomium</i> <i>Chrysonilia</i> <i>Cladosporium</i> <i>Colletotrichum</i> <i>Coniella</i> <i>Coniochaeta</i> <i>Contothyrum</i> <i>Cunninghamella</i> <i>Curvularia</i> <i>Dendryphiella</i> <i>Drechslera</i> <i>Emericella</i> <i>Epicoccum</i> <i>Eupenicillium</i> <i>Eurotium</i> <i>Fusarium</i> <i>Geniculosporium</i> <i>Geotrichum</i> <i>Gliocladium</i> <i>Greeneria</i> <i>Harzia</i> <i>Histoplasma</i> <i>Humicola</i> <i>Lecythophora</i> <i>Microdochium</i> <i>Monilia</i> <i>Mucor</i>	<i>Myrothecium</i> <i>Nectria</i> <i>Neosartorya</i> <i>Neurospora</i> <i>Nigrospora</i> <i>Nodulisporium</i> <i>Oidiodendron</i> <i>Omphalina</i> <i>Paecilomyces</i> <i>Penicillium</i> <i>Periconia</i> <i>Pestalotiopsis</i> <i>Phacidium</i> <i>Phialophora</i> <i>Phoma</i> <i>Phomopsis</i> <i>Pithomyces</i> <i>Pleospora</i> <i>Rhinocladia</i> <i>Rhizopus</i> <i>Scopulariopsis</i> <i>Scytalidium</i> <i>Sordaria</i> <i>Sphaeropsis</i> <i>Staphylocotrichum</i> <i>Stemphylium</i> <i>Syncephalastrum</i> <i>Talaromyces</i> <i>Thanatephorus</i> <i>Trichoderma</i> <i>Tricosporon</i> <i>Tricothecium</i> <i>Truncatella</i> <i>Ulocladium</i> <i>Verticillium</i> <i>Xylaria</i>	<i>Ajellomyces</i> <i>Albugo</i> <i>Ascochyta</i> <i>Bipolaris</i> <i>Boeremia</i> <i>Botryotinia</i> <i>Bulgaria</i> <i>Catelunostroma</i> <i>Cephalosporium</i> <i>Chalara</i> <i>Chalastospora</i> <i>Chloroscypha</i> <i>Coccidioides</i> <i>Cochliobolus</i> <i>Colacogloea</i> <i>Columnosphaeria</i> <i>Cronartium</i> <i>Cytospora</i> <i>Davidiella</i> <i>Diaporthe</i> <i>Didymella</i> <i>Dioszegia</i> <i>Dissoconium</i> <i>Dothidea</i> <i>Entrophospora</i> <i>Erysiphe</i> <i>Eudarlucia</i> <i>Exophiala</i> <i>Filobasidiella</i> <i>Glomerellales</i> <i>Gibberella</i> <i>Gigaspora</i> <i>Glonium</i> <i>Haplographium</i> <i>Holtermannia</i> <i>Hyaloscypha</i> <i>Hyphopichia</i> <i>Hypholoma</i> <i>Itersonilia</i> <i>Kabatiella</i> <i>Leptosphaerulina</i> <i>Leptosphaeria</i> <i>Lewia</i> <i>Magnaporthe</i> <i>Malassezia</i> <i>Massaria</i> <i>Meira</i> <i>Monilia</i> <i>Mycosphaerella</i> <i>Neofusicoccum</i> <i>Pandora</i> <i>Paraconiothyrium</i> <i>Peniophora</i> <i>Phaeosphaeria</i> <i>Piptoporus</i> <i>Plectosphaerella</i> <i>Pleurostoma</i> <i>Podospharea</i> <i>Puccinia</i> <i>Pyrenophora</i> <i>Ramularia</i> <i>Rhodosporidium</i> <i>Sarocladium</i> <i>Sclerotinia</i> <i>Sebacina</i> <i>Selenophoma</i> <i>Spathularia</i> <i>Sporomiella</i> <i>Sporisorium</i> <i>Stephanonectria</i> <i>Sydowia</i> <i>Teratosphaeria</i> <i>Tilletiopsis</i> <i>Thelebolus</i> <i>Tremellomycetes</i> <i>Uncinocarpus</i> <i>Ustilago</i> <i>Veluticeps</i> <i>Vuilleminia</i> <i>Walleimia</i> <i>Zymoseptoria</i>

Bactéries		<i>Achromobacter</i>	<i>Frankia</i>	<i>Ralstonia</i>
		<i>Acidiphilum</i>	<i>Frigoribacterium</i>	<i>Ramlibacter</i>
		<i>Acidocella</i>	<i>Frischella</i>	<i>Raoultella</i>
		<i>Acidovorax</i>	<i>Fructobacillus</i>	<i>Rathayibacter</i>
		<i>Aerococcus</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Rhodococcus</i>
		<i>Aeromonas</i>	<i>Gemmatimonas</i>	<i>Rhodoferax</i>
		<i>Alistipes</i>	<i>Geobacillus</i>	<i>Rhodopirellula</i>
		<i>Alkaliphilus</i>	<i>Geodermatophilus</i>	<i>Rhodoplanes</i>
		<i>Amnibacterium</i>	<i>Gilliamella</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
		<i>Anaerococcus</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Rickettsia</i>
		<i>Anoxybacillus</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Riemerella</i>
		<i>Arthrobacter</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Roseburia</i>
		<i>Aurantimonas</i>	<i>Halomonas</i>	<i>Roseomonas</i>
		<i>Bacteroides</i>	<i>Halospirulina</i>	<i>Rubrivivax</i>
		<i>Balneimonas</i>	<i>Helicobacter</i>	<i>Ruegeria</i>
		<i>Bifidobacterium</i>	<i>Herbaspirillum</i>	<i>Ruminococcus</i>
		<i>Blautia</i>	<i>Hermiimonas</i>	<i>Salinibacterium</i>
		<i>Bordetella</i>	<i>Holospira</i>	<i>Salinispora</i>
		<i>Bosea</i>	<i>Hymenobacter</i>	<i>Salmonella</i>
		<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Janthinobacterium</i>	<i>Sanguibacter</i>
		<i>Butyrivibrio</i>	<i>Kineococcus</i>	<i>Schlegelella</i>
		<i>Caenimonas</i>	<i>Legionella</i>	<i>Sediminibacterium</i>
		<i>Campylobacter</i>	<i>Leptospira</i>	<i>Segetibacter</i>
		<i>Cardinium</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Shewanella</i>
		<i>Carnobacterium</i>	<i>Leucobacter</i>	<i>Shigella</i>
		<i>Cedecea</i>	<i>Limnohabitans</i>	<i>Shinella</i>
		<i>Cellulomonas</i>	<i>Luteimonas</i>	<i>Skermanella</i>
		<i>Cellulophaga</i>	<i>Lutiella</i>	<i>Sodalis</i>
		<i>Cellvibrio</i>	<i>Lysobacter</i>	<i>Sorangium</i>
		<i>Chromobacterium</i>	<i>Marinomonas</i>	<i>Sphingobium</i>
		<i>Chryseomonas</i>	<i>Massilia</i>	<i>Sphingomonas</i>
		<i>Clavibacter</i>	<i>Megamonas</i>	<i>Sphingopyxis</i>
		<i>Clostridiales</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Spirosoma</i>
		<i>Comamonas</i>	<i>Methylibium</i>	<i>Sporosarcina</i>
		<i>Conexibacter</i>	<i>Microlunatus</i>	<i>Steroidobacter</i>
		<i>Corynebacterium</i>	<i>Morganella</i>	<i>Streptococcus</i>
	<i>Curvibacter</i>	<i>Moryella</i>	<i>Streptomyces</i>	
	<i>Cyanothece</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Swaminathania</i>	
	<i>Defluviobacter</i>	<i>Mycoplasma</i>	<i>Syntrophus</i>	
	<i>Deinococcus</i>	<i>Myxococcus</i>	<i>Tanticharoenia</i>	
	<i>Desulfosporosinus</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Teichococcus</i>	
	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Nevskia</i>	<i>Telluria</i>	
	<i>Diaphorobacter</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Telmatospirillum</i>	
	<i>Dickeya</i>	<i>Orbus</i>	<i>Terribacillus</i>	
	<i>Dietzia</i>	<i>Oribacterium</i>	<i>Tetrathiobacter</i>	
	<i>Duganella</i>	<i>Orientia</i>	<i>Thermomonas</i>	
	<i>Dyadobacter</i>	<i>Oscillospira</i>	<i>Thioalkalivibrio</i>	
	<i>Dyella</i>	<i>Oxalobacter</i>	<i>Tolomonas</i>	
	<i>Dysgonomonas</i>	<i>Pannonibacter</i>	<i>Trabulsiella</i>	
	<i>Elizabethkingia</i>	<i>Pectobacterium</i>	<i>Tsakamurella</i>	
	<i>Empedobacter</i>	<i>Pelomonas</i>	<i>Variovorax</i>	
	<i>Enhydrobacter</i>	<i>Phyllobacterium</i>	<i>Veillonella</i>	
	<i>Escherichia</i>	<i>Planifilum</i>	<i>Vibrio</i>	
	<i>Exiguobacterium</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Wautersiella</i>	
	<i>Faecalibacterium</i>	<i>Pseudoflavonifractor</i>	<i>Wolbachia</i>	
	<i>Fibrobacter</i>	<i>Rahnella</i>	<i>Xanthomonas</i>	
	<i>Flavimonas</i>		<i>Xylophilus</i>	

(D'après : Leveau et Tech, 2011 ; Bokulich *et al.*, 2012b ; Setati *et al.*, 2012 ; Bokulich *et al.*, 2013a, 2013b ; Martins *et al.*, 2013 ; Campanaro *et al.*, 2014 ; Campisano *et al.*, 2014 ; David *et al.*, 2014 ; Perazzolli *et al.*, 2014 ; Pinto *et al.*, 2014 ; Rousseaux *et al.*, 2014 ; Taylor *et al.*, 2014 ; Burns *et al.*, 2015 ; Knight *et al.*, 2015 ; Piao *et al.*, 2015 ; Pinto *et al.*, 2015 ; Setati *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2015 ; Zarraonandia *et al.*, 2015 ; Bokulich *et al.*, 2016 ; Bouffaud *et al.*, 2016 ; Boynton et Greig, 2016 ; Faist *et al.*, 2016 ; Grangeteau *et al.*, 2016a ; Kecskeméti *et al.*, 2016 ; Marzano *et al.*, 2016 ; Portillo *et al.*, 2016 ; Portillo et Mas, 2016 ; Salvetti *et al.*, 2016 ; Stefanini *et al.*, 2016 ; Belda *et al.*, 2017 ; Castañeda et Barbosa, 2017 ; De Filippis *et al.*, 2017 ; König *et al.*, 2017 ; Morgan *et al.*, 2017 ; Morrison-Whittle *et al.*, 2017 ; Stefanini *et al.*, 2017 ; Sternes *et al.*, 2017 ; Canfora *et al.*, 2018 ; Eichmeier *et al.*, 2018 ; Kioroglou *et al.*, 2018 ; Lewis *et al.*, 2018 ; Li *et al.*, 2018 ; Morrison-Whittle et Goddard, 2018 ; Simonin *et al.*, 2018 ; Stefanini et Cavalieri, 2018 ; Wei *et al.*, 2018 ; Zhang *et al.*, 2018)

De plus, l'utilisation d'amorces indexées peut également induire une amplification préférentielle en favorisant l'amplification de certaines espèces par rapport à d'autres. Cette amplification préférentielle dépend également de la température d'hybridation des amorces et du nombre de cycles de PCR (Sipos *et al.*, 2007).

Les trois techniques NGS les plus utilisées dans le domaine viti-vinicole sont le 454 pyroséquençage, le séquençage Illumina Mi-Seq et le séquençage Illumina WGS (Whole Genome Sequencing) (Salveti *et al.*, 2016 ; Kioroglou *et al.*, 2018).

Le 454 pyroséquençage

Décrite pour la première fois en 2005, le 454-pyroséquençage est une technique NGS utilisant le séquençage par synthèse (Margulies *et al.*, 2005). Le principe de cette technique est basé sur la détection du pyrophosphate libéré par la fixation des nucléotides pendant le séquençage. Au cours de la première étape de dénaturation, la ligature des séquences « adaptateurs » aux fragments d'ADN ciblés pour le séquençage est réalisée. Ensuite, ces fragments ligaturés sont attachés à des billes en reconnaissant leur séquence « adaptateur » présente sur la surface des billes. De cette façon, chaque bille est associée à un seul fragment d'ADN. Ensuite, chaque bille est isolée dans un micro-milieu aqueux permettant l'amplification du fragment d'ADN. Cette amplification est réalisée par émulsion PCR produisant environ un million de copies de ce fragment. Par la suite, les billes sont transférées sur une plaque en fibres optiques ou « picotiter » (PTP) où le pyroséquençage prend lieu. Cela consiste à activer une série de réactions enzymatiques (un type de nucléotide par cycle) permettant la synthèse d'un brin complémentaire au fragment d'ADN choisi. La fixation des nucléotides à leur séquence complémentaire libère une molécule de pyrophosphate induisant un signal fluorescent. Ainsi, la séquence du fragment d'ADN est reconstituée par la détection de la lumière fluorescente. L'utilisation des plaques « picotiter » permet de réaliser, simultanément, des centaines de milliers de réactions, ce qui augmente considérablement le débit de séquençage.

Dans la filière viti-vinicole, le 454-pyroséquençage a été utilisé pour la caractérisation des communautés fongiques (levures et moisissures) de vignobles (Castañeda et Barbosa, 2017), sur des racines de vignes (Bouffaud *et al.*, 2016), sur des feuilles de vignes (Perazzolli *et al.*, 2014 ; Pinto *et al.*, 2014, 2015), sur des baies de raisin (Taylor *et al.*, 2014 ; Kecskeméti *et al.*, 2016 ; Stefanini *et al.*, 2017) ainsi qu'au cours de FA (David *et al.*, 2014 ; Piao *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2015 ; Portillo et Mas, 2016 ; Stefanini *et al.*, 2016 ; De Filippis *et al.*, 2017 ;

Grangeteau *et al.*, 2017). Cette méthode a également été utilisée pour caractériser les communautés bactériennes trouvées sur des feuilles de vigne (Campisano *et al.*, 2014 ; Pinto *et al.*, 2014) et au cours des fermentations (Pinto *et al.*, 2015 ; Portillo et Mas, 2016).

Le séquençage Illumina ciblé (Mi-Seq)

Suite aux travaux fondateurs de Fedurco *et al.* (2006) et Turcatti *et al.* (2008), la technique Illumina a été développée et la commercialisation du premier séquenceur Genome Analyzer (GA) a eu lieu en 2006. Depuis ce lancement, la technique Illumina Mi-Seq a connu un très grand succès étant donné les avantages qu'elle présente par rapport au 454-pyroséquençage. En effet, l'Illumina Mi-Seq est une technique extrêmement performante qui permet (i) de réduire les erreurs qui peuvent avoir lieu au cours du séquençage (Luo *et al.*, 2012) et (ii) d'augmenter le nombre d'échantillons étudiés simultanément et par conséquent réduire le coût de l'analyse. Ainsi, ces avantages ont fait de la technique Illumina, la technologie NGS la plus utilisée sur le marché à l'heure actuelle (Kioroglou *et al.*, 2018).

La technique Illumina se base sur le principe du séquençage par synthèse et se divise en quatre grandes étapes : (i) la préparation de bibliothèques, (ii) la génération des clusters, (iii) le séquençage et (iv) l'analyse bio-informatique des séquences (**Fig. 5**). Premièrement, après une étape d'amplification par PCR, des adaptateurs sont ligaturés aux deux extrémités des fragments amplifiés. Ensuite, ces adaptateurs sont fixés sur leurs séquences complémentaires accrochées sur une plaque solide appelée « Flow cell ». Chaque « Flow cell » est composée de plusieurs canaux dont chacun contient 2 adaptateurs différents. Deuxièmement, suite à l'activité de l'ADN polymérase, un brin complémentaire va être synthétisé à partir des fragments initialement attachés sur la « Flow cell ». L'extrémité libre de ces fragments se replie pour s'hybrider au deuxième type d'adaptateur sur la « Flow cell » en créant un pont. Ces fragments seront, à leur tour, amplifiés par « Bridge PCR » ce qui va créer, pour chaque séquence, plusieurs copies identiques connues sous le nom de cluster. Ensuite, afin de déterminer les séquences nucléotidiques de ces fragments (Read 1), cette technique utilise des nucléotides modifiés et étiquetés avec un fluorochrome. Les nucléotides ont leur extrémité 3'-hydroxyle inactive afin d'assurer l'incorporation d'un seul nucléotide à chaque cycle. Les fluorochromes sont excités par laser pour émettre un signal lumineux spécifique à chaque nucléotide, qui sera détecté par un dispositif à transfert de charge (CCD).

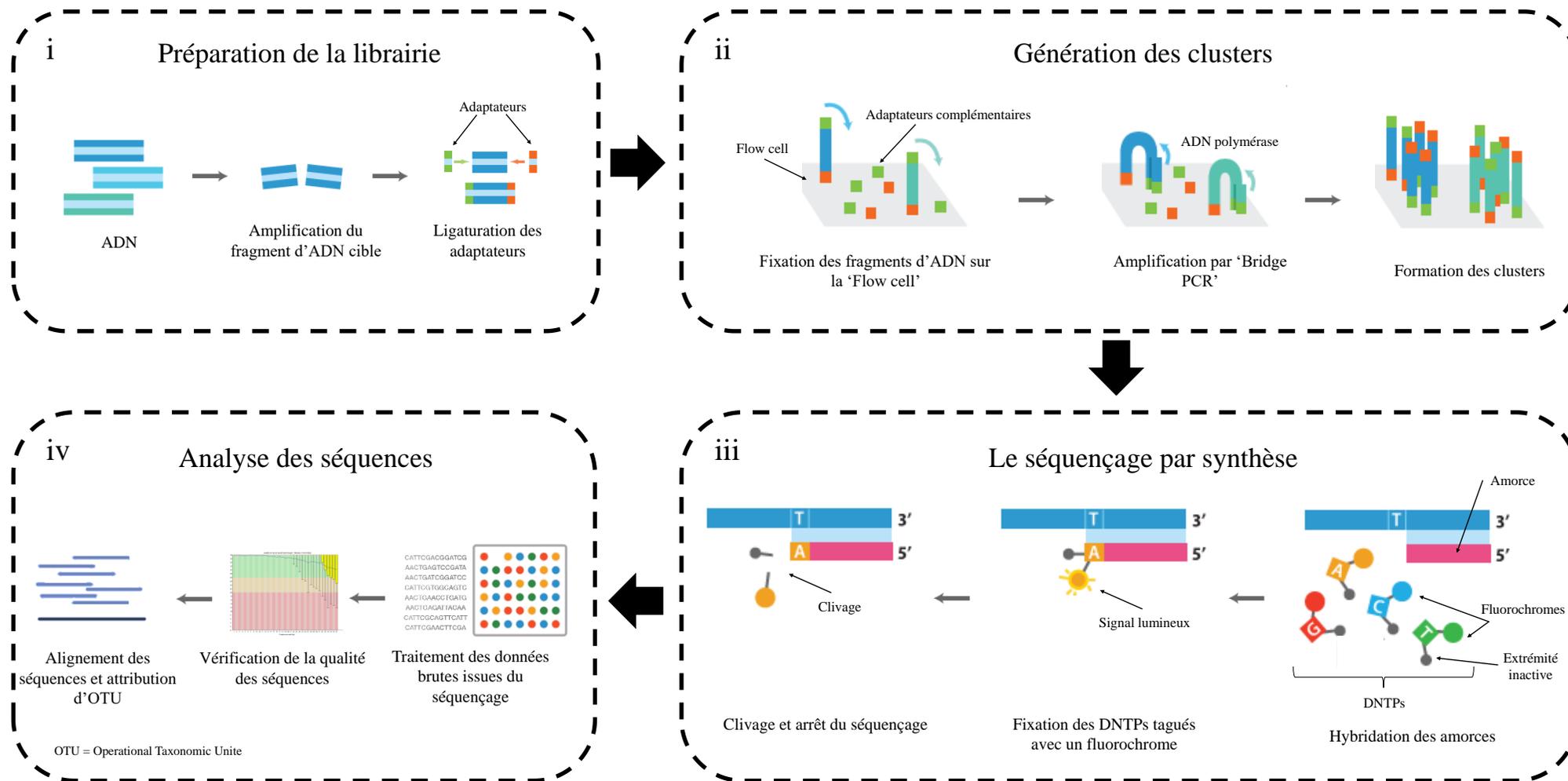


Figure 5 : Principe de la technique de séquençage Illumina ciblé (Mi-Seq).

(source personnelle)

Ce procédé de séquençage est répété une deuxième fois sur le brin complémentaire de chacun des fragments séquencés (Read 2). Finalement, les séquences générées sont groupées en fonction des Read 1 et 2 et sont ensuite traitées par des pipelines bio-informatiques afin d'attribuer des unités opérationnelles taxonomiques (OTUs). Ces OTUs obtenus sont comparées avec des banques de données pour l'identification. L'inconvénient principal de la technique Illumina est l'utilisation obligatoire d'un ADN contrôle pour le chargement des échantillons. En effet, une surcharge de ce contrôle peut entraîner un chevauchement des clusters et une mauvaise qualité du séquençage.

Cette technique a été utilisée pour caractériser des populations de levures, bactéries et moisissures dans des vignobles (Burns *et al.*, 2015), sur des ceps de vigne (Faist *et al.*, 2016), sur des baies de raisin (Marzano *et al.*, 2016) et au cours des FA (Bokulich *et al.*, 2012b, 2014 ; Boynton et Greig, 2016 ; Sternes *et al.*, 2017 ; Li *et al.*, 2018 ; Simonin *et al.*, 2018). De plus, cette technique a été appliquée également à l'étude de la biodiversité dans des environnements reliés au vin (sol, murs et matériel vinaire) (Bokulich *et al.*, 2013a).

Le séquençage Illumina WGS

Le séquençage WGS (Whole-Genome Sequencing) est une méthode dérivée du séquençage Illumina Mi-Seq. Cette méthode implique le séquençage de l'ensemble du génome des microorganismes présents dans un échantillon à un débit et une résolution très élevée. Récemment, Salvetti *et al.* (2016) ont utilisé ce type de séquençage pour la première fois afin d'évaluer la diversité fonctionnelle du consortium microbien associée aux baies pour la production de raisins secs au cours de deux processus différents de séchage (traditionnel et accéléré). Pour des baies de raisin séchées de façon traditionnelle, une forte abondance de gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des acides aminés est observée alors que pour les baies de raisin séchées de façon accélérée, les gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des glucides sont plus présents. Sterens *et al.* (2017) ont également réalisé une étude comparative entre la technique de séquençage WGS et le séquençage ciblé de la région ITS (Illumina Mi-Seq) pour étudier les dynamiques des populations levuriennes au cours des FA. Par comparaison des données obtenues, les résultats du séquençage WGS ont révélé un biais dans l'estimation des abondances relatives du séquençage ciblé qui tend à surestimer l'abondance de certains genres levuriens non-*Saccharomyces* comme *Metschnikowia*.

Finalement, toutes les techniques NGS et non-NGS ont permis de caractériser le consortium microbien depuis le vignoble jusqu'à la fin des fermentations. Cependant, la majorité de ces méthodes se sont focalisées sur la biodiversité et l'évolution des populations au cours du processus de vinification et très peu d'études se sont intéressées aux environnements reliés au vin.

Partie 2 : Les populations microbiennes résidentes dans les environnements reliés au vin

Au cours du processus de vinification, les baies de raisin, le moût et le vin rentrent en contact avec plusieurs environnements, d'abord dans la cuverie puis ensuite dans la cave d'élevage. Ces environnements, nommés WREs (Wine Related Environments), regroupent des surfaces qui seront en contact direct avec les différentes matrices comme le matériel vinaire (pompes, pressoir, conquêts de réception, tuyaux de transport, ...), ou des surfaces en contact indirect comme le sol, les murs et l'air.

Une présentation synthétique de la biodiversité des populations microbiennes identifiées sur les WREs dans des cuveries/caves en production est réalisée dans la partie ci-dessous en fonction des méthodes d'analyses employées (cf partie 1) : les méthodes non-NGS (incluant les méthodes culture-dépendante et indépendante) et les méthodes NGS. De plus, la persistance des populations microbiennes sur les WREs et leur implication dans le processus de vinification est également discutées.

1. Biodiversité microbienne dans une cuverie en production

L'environnement de la cuverie, lieu de réception de la vendange et de la fermentation alcoolique, est l'environnement le plus étudié. A notre connaissance, 18 études décrivent à ce jour la biodiversité microbienne (levures, bactéries, moisissures et champignons) sur les WREs de cuveries en production. Les espèces microbiennes identifiées sur les différents WREs par méthodes non-NGS et NGS sont présentés dans la **figure 6**.

1.1 Par les méthodes non-NGS

La majorité des études (17/18) décrivant la biodiversité microbienne sur les WREs des cuveries ont été réalisées avec des méthodes non-NGS.

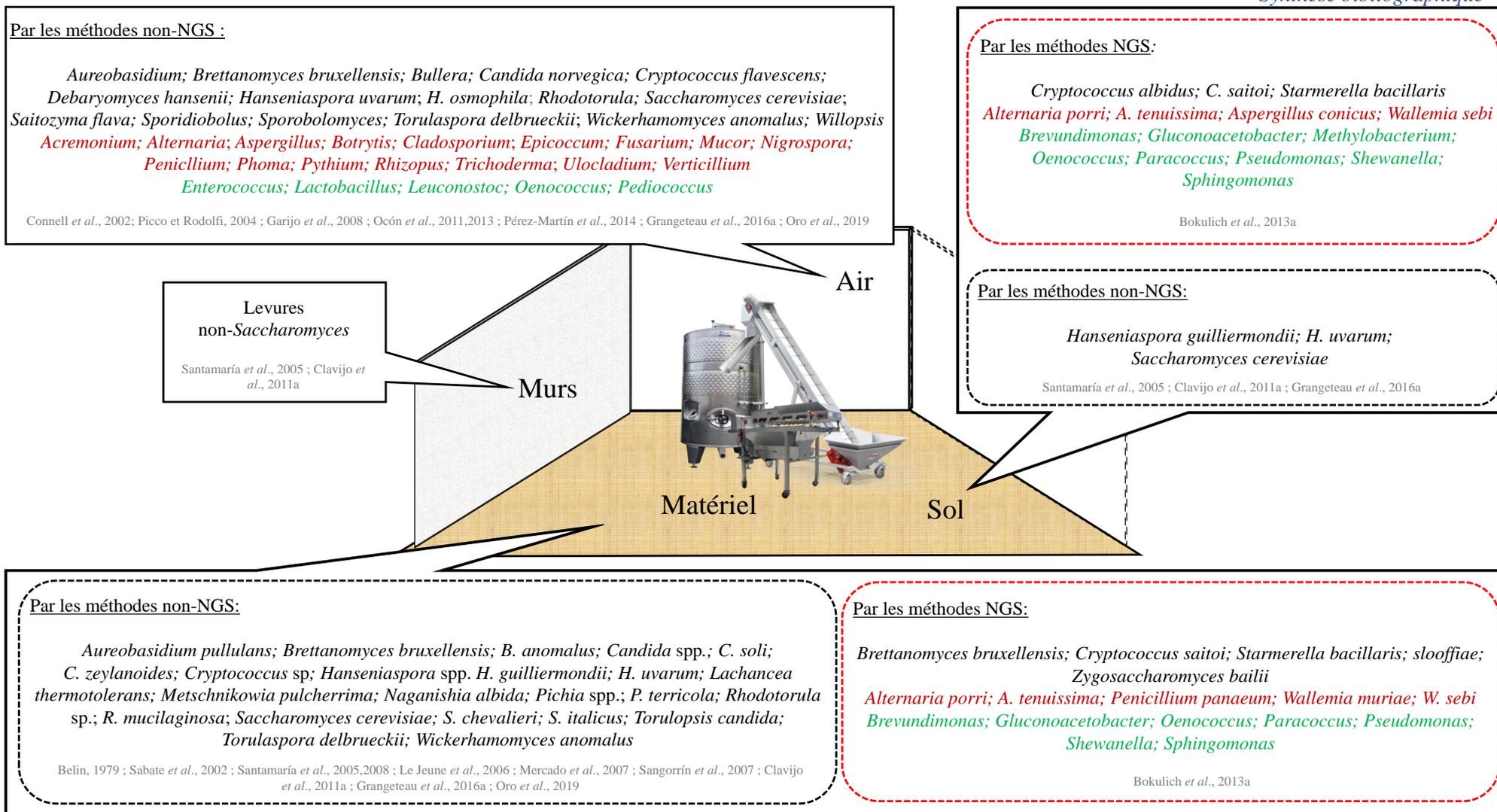


Figure 6 : Les différents genres et espèces microbiennes identifiés (méthodes non-NGS [] et [] NGS) sur les environnements liés au vin (sol, murs, air et matériel vinaire) d’une cuverie en production.

([] Levures [] Champignons et Moisissures [] Bactéries)

En utilisant la méthode PCR ITS-RFLP, la présence des genres levuriens *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Lachancea*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulasporea* et *Zygosaccharomyces* a été mise en évidence dans deux cuveries en production avant l'entrée des vendanges, sur un ensemble de WREs sans distinction entre le sol, les murs et le matériel vinaire (Ciani *et al.*, 2004 ; Ocón *et al.*, 2010).

Peu d'études décrivent la biodiversité d'un sol de cuverie. En effet, une seule étude recense la présence de levures non-*Saccharomyces* (non identifiées) et de l'espèce *S. cerevisiae* par mt-RFLP au niveau du sol d'une cuverie en production avant le début de la FA (Clavijo *et al.*, 2011a) (**Fig. 6**). Seuls Grangeteau *et al.* (2016a), en utilisant la technique IR-TF, mettent en évidence la présence de plusieurs souches appartenant aux espèces *H. uvarum* et *H. guilliermondii* sur le sol d'une cuverie (**Fig. 6**).

Au niveau des murs, très peu d'études se sont intéressées à la biodiversité levurienne de cette surface. En effet, la présence d'isolats de levures non-*Saccharomyces* sur les murs a été mentionnée dans les études de Santamaría *et al.* (2005) et Clavijo *et al.* (2011a), cependant ces isolats n'ont pas été identifiés. Concernant l'espèce *S. cerevisiae*, sa présence sur les murs n'a jamais été décrite.

La majeure partie des études (11/17) se sont intéressées à décrire la biodiversité levurienne présente sur le matériel vinaire, seul WRE en contact direct avec la matrice moût/vin. Ainsi, une grande diversité a été mise en évidence, constituée de genres levuriens *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* avec une proportion plus élevée de levures non-*Saccharomyces* (90%, 72% et 64% de la population levurienne totale, respectivement) (Sabate *et al.*, 2002 ; Sangorrín *et al.*, 2007 ; Ocón *et al.*, 2010). Parmi les levures non-*Saccharomyces*, les genres *Aureobasidium*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Hanseniaspora*, *Lachancea*, *Metschnikowia*, *Naganishia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Torulasporea* et *Wickerhamomyces* ont été isolés sur le matériel vinaire de différentes cuveries en production (**Fig. 6**). En ce qui concerne l'espèce *S. cerevisiae*, différentes souches commerciales (Santamaría *et al.*, 2005 ; Clavijo *et al.*, 2011a) et indigènes (Ciani *et al.*, 2004 ; Santamaría *et al.*, 2005 ; Mercado *et al.*, 2007) ont été identifiées sur le matériel vinaire. Par ailleurs, la colonisation du matériel vinaire par *S. cerevisiae* semble être influencée par le type de matériel. Selon Mercado *et al.*, (2007), le pressoir et les tuyaux de transport des moûts et des vins sont les deux types de matériel hébergeant le nombre le plus élevé d'isolats de *S. cerevisiae*. En

effet, 30 isolats sur 51 (avant FA du millésime 2001) et 43 isolats sur 85 (avant FA du millésime 2002) ont été retrouvés au niveau de ces deux types de matériel (presseur et tuyaux de transport).

L'air d'une cuverie en production, autre WRE, a fait l'objet de travaux. Contrairement aux autres WREs (sol, murs et matériel), la biodiversité dans l'air d'une cuverie a été étudiée non seulement au niveau de la population levurienne, mais également au niveau des populations de moisissures, champignons et de bactéries (**Fig. 6**). Pour la biodiversité levurienne, les genres *Aureobasidium*, *Brettanomyces*, *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saitozyma*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Torulasporea*, *Wickerhamomyces* et *Willopsis* ont été identifiés dans l'air de différentes cuveries avec des variations importantes dans la proportion de ces genres (Connell *et al.*, 2002 ; Ocón *et al.*, 2013 ; Pérez-Martín *et al.*, 2014). En effet, certaines études mettent en évidence que 100% des genres identifiés au cours des périodes pré et post FA sont des levures non-*Saccharomyces*, alors que pendant la période des fermentations (en lien avec les activités humaines et les aérosols engendrés), c'est uniquement l'espèce *S. cerevisiae* qui est présente (Garijo *et al.*, 2008 ; Ocón *et al.*, 2013). Quant aux populations de moisissures et de champignons, les genres *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Phoma*, *Pythium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Ulocladium* et *Verticillium* ont été identifiés (Picco et Rodolfi, 2004 ; Garijo *et al.*, 2008 ; Ocón *et al.*, 2011). De plus, un suivi de l'évolution des moisissures et des champignons dans l'air d'une cuverie a également été réalisé (Garijo *et al.*, 2008 ; Ocón *et al.*, 2011). Ainsi, les genres *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium* sont majoritairement présents et systématiquement retrouvés quel que soit la période de l'année tandis que d'autres genres ont été détectés à des périodes spécifiques. A titre d'exemple, le genre *Botrytis* a uniquement été détecté pendant la période des fermentations (Garijo *et al.*, 2008) alors que le genre *Cladosporium* est détecté pendant la période des fermentations et persiste jusqu'à deux mois après FA (Ocón *et al.*, 2011). En comparant la biodiversité des moisissures et champignons dans l'air de 6 cuveries différentes, les résultats obtenus confirment que les genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont les genres majoritaires avec la présence d'un nombre très élevé d'espèces différentes (7 espèces du genre *Aspergillus* et 16 espèces du genre *Penicillium*) (Picco et Rodolfi, 2004).

La présence de bactéries lactiques (*Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Pediococcus*) dans l'air de cuverie en production a également été décrite par Pérez-Martín *et al.*, (2014) (**Fig. 6**).

1.2 Par les méthodes NGS

Le développement des techniques NGS a permis l'accès à un nombre plus important de genres et espèces microbiennes au niveau des moûts et vins (Morgan *et al.*, 2017). Concernant les WREs d'une cuverie en production, l'étude de Bokulich *et al.* (2013a) est la seule étude décrivant, à ce jour, la biodiversité microbienne dans l'environnement d'une cuverie en production par méthode NGS (Illumina Mi-Seq). Les auteurs démontrent ainsi la présence d'espèces levuriennes jamais décrites sur les WREs par les méthodes non-NGS. A titre d'exemple, les espèces *Cryptococcus saitoi*, *Cryptococcus albidus* et *Starmerella bacillaris* ont été détectées sur le sol de la cuverie et les espèces *B. bruxellensis*, *Cr. saitoi*, *Rhodotorula slooffiae*, *Starmerella bacillaris* et *Z. bailii* détectées sur le matériel vinaire (**Fig. 6**). Au niveau de l'espèce *S. cerevisiae*, et contrairement à ce qui a été observé par d'autres études et par d'autres techniques non-NGS (Sabate *et al.*, 2002 ; Sangorrín *et al.*, 2007 ; Ocón *et al.*, 2010), elle apparaît dominante sur le matériel de la cuverie avant et au cours de la FA. En plus de la population levurienne, Bokulich *et al.* (2013a) ont mis en évidence, pour la première fois, la présence de différents genres de moisissures, champignons et bactéries sur le sol et le matériel vinaire, tels que les genres de moisissures *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Wallemia* et les genres bactériens *Brevundimonas*, *Gluconoacetobacter*, *Oenococcus*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Shewanella* et *Sphingomonas* (**Fig. 6**).

La biodiversité microbienne des WREs a fait l'objet de nombreuses études même si certains environnements comme les murs ont été peu étudiés. Par contre, à notre connaissance, les études se focalisant sur la persistance des espèces microbiennes identifiées sur les WREs et sur leur capacité à s'implanter au cours du processus de vinification sont beaucoup moins nombreuses.

1.3 Persistance des populations levuriennes des WREs de cuverie en production

Plusieurs études démontrent la persistance de différentes espèces de levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* sur les WREs de cuverie en production.

Concernant l'espèce *S. cerevisiae*, la persistance de différentes souches dans l'environnement de cuverie en production pendant plusieurs millésimes a été suggérée pour la première fois dans les travaux de Frazier et Dubourdieu en 1992. De même, la persistance de *S. cerevisiae* sur le matériel vinaire de cuverie ayant utilisé des souches commerciales a été mise en évidence par Santamaría *et al.* (2005). En effet, en utilisant la méthode mt-RFLP, les auteurs démontrent que, bien qu'elle ne soit plus utilisée, une souche commerciale de *S. cerevisiae* est capable de

persister sur le matériel vinaire un an après sa dernière utilisation. De même, en utilisant la mt-RFLP et la PCR Interdelta, six souches indigènes de *S. cerevisiae* ont été identifiées sur le matériel vinaire et retrouvées pendant deux millésimes consécutifs (Mercado *et al.*, 2007).

Plusieurs souches de *H. uvarum* et *H. guilliermondii* identifiées par IR-TF et isolées au cours des FA d'un premier millésime ont été à nouveau isolées après FA sur le sol et le matériel vinaire durant le millésime suivant (Grangeteau *et al.*, 2016a).

Ainsi, la mise en évidence de la persistance des levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* pendant et en dehors des périodes fermentaires démontre que les WREs (principalement le sol et le matériel vinaire) constituent une véritable niche écologique pour les levures permettant l'établissement d'une flore résidante de cuverie.

1.4 Implication des populations levuriennes isolées des WREs de cuverie en production dans le processus de vinification

Au-delà de la persistance des populations levuriennes dans l'environnement de cuverie en production, certaines études ont mis en évidence que la flore résidante de cuverie (*Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*) était capable de jouer un rôle dans le processus de vinification.

Le transfert d'une souche commerciale de l'espèce *S. cerevisiae* présente sur le matériel vinaire avant FA vers les moûts/vins du même millésime a été mis en évidence (Le Jeune *et al.*, 2006 ; Mercado *et al.*, 2007 ; Clavijo *et al.*, 2011a). Dans certains cas, le transfert de souches commerciales de *S. cerevisiae* isolées du matériel vinaire peut également être observé pendant deux millésimes successifs (Santamaría *et al.*, 2005). De même, le transfert de souches indigènes résidentes dans l'environnement de cuverie a été démontré vers les moûts/vins du même millésime (Ciani *et al.*, 2004 ; Santamaría *et al.*, 2008).

Pour les levures non-*Saccharomyces*, une seule étude récente décrit l'implication de six souches de *H. uvarum* et trois souches de *H. guilliermondii* isolées sur le sol et le matériel vinaire dans les FA du millésime suivant (Grangeteau *et al.*, 2016a).

2. Biodiversité microbienne dans une cave d'élevage

Si la biodiversité des WREs de cuveries en production a fait l'objet d'études, peu de travaux ont porté sur la biodiversité microbienne dans l'environnement d'une cave d'élevage. A notre connaissance, 11 études existent à l'heure actuelle décrivant la biodiversité microbienne

(levures, bactéries, moisissures et champignons) sur différents WREs dans la cave : le sol, les murs, le matériel, l'air et les fûts (Peynaud et Domercq, 1959 ; Belin, 1979 ; Simeray *et al.*, 2000,2001 ; Picco et Rodolfi, 2004 ; Clavijo *et al.*, 2011a ; Ocón *et al.*, 2011 ; Barata *et al.*, 2013 ; González-Arenzana *et al.*, 2013 ; Bokulich *et al.*, 2013a ; Ocón *et al.*, 2014). Les genres et espèces microbiennes identifiés sur les différents WREs (par les méthodes non-NGS et NGS) sont présentés dans la **figure 7**.

2.1 Par les méthodes non-NGS

Par ces méthodes, seules les populations fongiques présentes dans l'environnement d'une cave d'élevage ont été étudiées.

Les informations disponibles à l'heure actuelle sur la biodiversité levurienne des WREs de caves d'élevage reposent essentiellement sur les résultats décrits par deux études anciennes utilisant des méthodes d'identification basées sur la morphologie des colonies développées sur un milieu gélosé (Peynaud et Domercq, 1959 ; Belin, 1979). Les genres *Azymocandida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Tausonia*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Wickerhamomyces* et *Zygosaccharomyces* ont été retrouvés au niveau du sol, les genres *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia* et *Torulopsis* ont été retrouvés sur les murs et uniquement les genres *Azymocandida* et *Saccharomyces* sur le matériel vinaire (Peynaud et Domercq, 1959 ; Belin, 1979).

Plus récemment d'autres études ont décrit la biodiversité levurienne des WREs de cave d'élevage et plus particulièrement les fûts, par méthodes non-NGS. La présence des genres *Azymocandida*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Kregervanrija*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saturnispora*, *Tausonia*, *Torulaspora*, *Torulopsis*, *Wickerhamomyces* et *Zygosaccharomyces* a été démontrée au niveau de la surface extérieure des fûts utilisés au cours de l'élevage (Peynaud et Domercq, 1959 ; Belin, 1979 ; Clavijo *et al.*, 2011a ; Barata *et al.*, 2013 ; González-Arenzana *et al.*, 2013). De plus, la biodiversité levurienne a également été décrite à la surface interne de fûts utilisés au cours de l'élevage ainsi que de fûts neufs qui n'avaient jamais servi à l'élevage. Au niveau de fûts usagés, *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Nakazawaea*, *Pichia*, *Saccharomyces* et *Zygosaccharomyces* sont les genres levuriens majoritairement présents à l'intérieur des fûts comme démontré par Belin, (1979), Guzzon *et al.*, (2011) et Barata *et al.*, (2013). Cependant, l'espèce *S. cerevisiae* est la seule espèce décrite jusqu'à présent à la surface interne de fûts neufs (Goddard *et al.*, 2010).

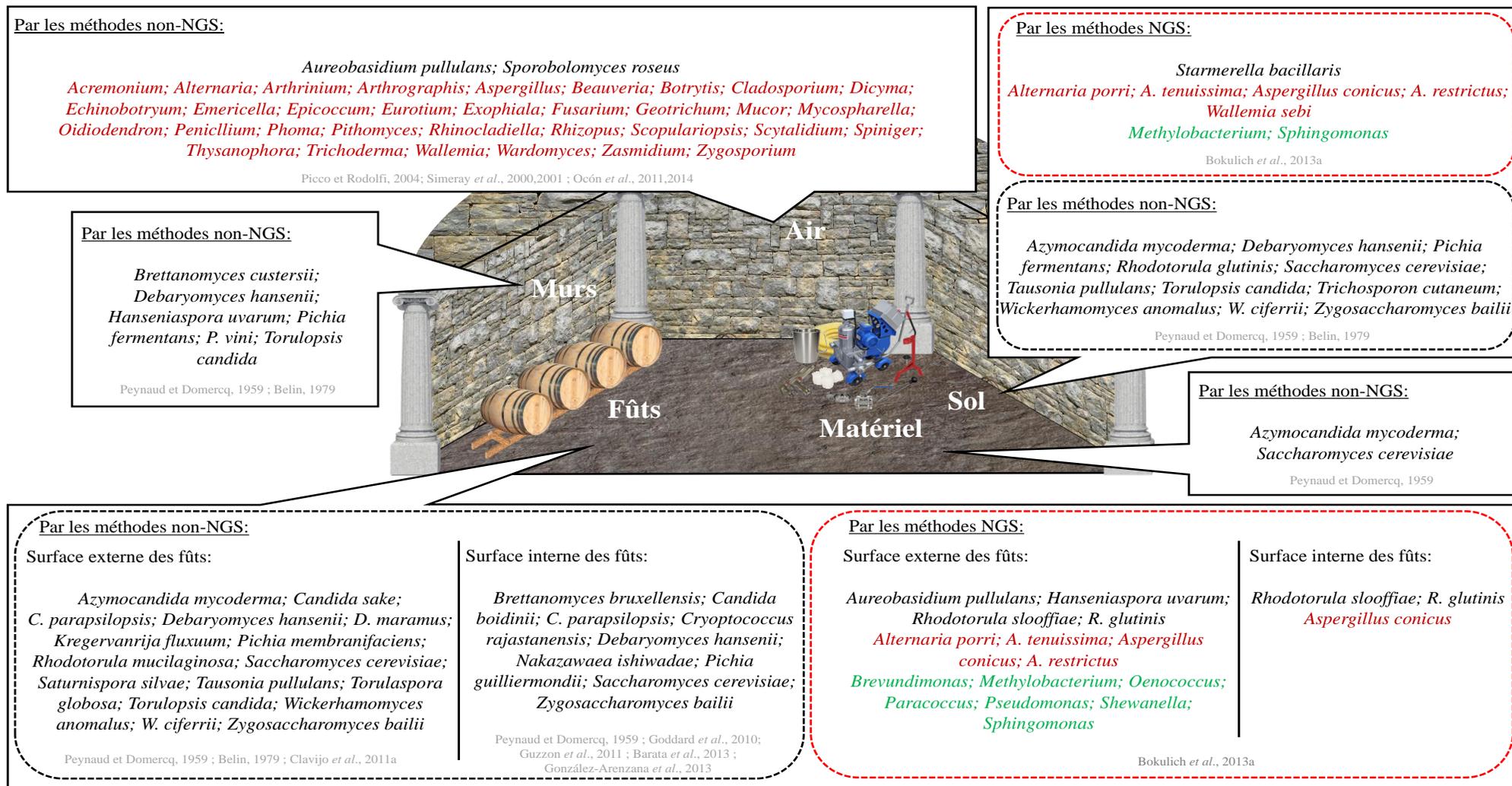


Figure 7 : Les différents genres et espèces microbiennes identifiés (méthodes non-NGS [dashed box] et [dashed red box] NGS) sur les environnements reliés au vin (sol, murs, air et matériel vinaire) d'une cave d'élevage.

([black square] Levures [red square] Champignons et Moisissures [green square] Bactéries)

La biodiversité levurienne a également été analysée sur l'eau de nettoyage des fûts. En utilisant la technique PCR-DGGE, Renouf *et al.* (2007) ont mis en évidence la présence des espèces *B. bruxellensis*, *C. stellata*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus cellulolyticus* et *S. cerevisiae*.

La biodiversité levurienne dans l'air d'une cave d'élevage a fait l'objet d'une seule étude révélant la présence des espèces levuriennes *Aureobasidium pullulans* et *Sporobolomyces roseus* au cours de la période d'élevage (Picco et Rodolfi, 2004) (**Fig. 7**).

Par contre, la diversité des moisissures et champignons a fait l'objet de plusieurs études et spécifiquement dans l'air des caves (5). Ainsi, les genres *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Penicillium* et *Trichoderma* ont identifiés (Picco et Rodolfi, 2004) et présentent des dynamiques différentes sur une année (Simeray *et al.*, 2000 et Ocón *et al.*, 2011). A titre d'exemple, le genre *Penicillium* décrit comme majoritaire, présente un niveau de population stable tout au long de l'année alors que d'autres genres comme *Cladosporium* (Ocón *et al.*, 2011) et *Botrytis* (Simeray *et al.*, 2000) semblent être introduits par l'activité humaine (isolés uniquement après l'entonnage). Vingt-sept genres minoritaires (isolés 1 à 2 fois au cours de l'année) de moisissures et champignons (*Acremonium*, *Arthrographis*, *Arthrimum*, *Beauveria*, *Dicyna*, *Echinobotryum*, *Emericella*, *Epicoccum*, *Eurotium*, *Exophiala*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Mycosphearella*, *Oidiodendron*, *Phoma*, *Pithomyces*, *Rhinochadiella*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis*, *Scytalidium*, *Spiniger*, *Thysanophora*, *Wallemia*, *Wardomyces*, *Zasmidium* et *Zygosporium*) ont également été identifiés dans l'air d'une cave d'élevage (**Fig. 7**). Les populations de moisissures et champignons dans l'air des caves semblent également varier en fonction de l'âge de la cave. En effet, une faible diversité de moisissures et champignons est observée pour une cave d'élevage en production depuis 10 ans en comparaison avec des caves d'élevage en production depuis plus de 30 ans (Ocón *et al.*, 2014). De plus, les populations de moisissures et champignons varient de façon saisonnière en fonction des niveaux d'humidité et de température de l'air (Simeray *et al.*, 2000 ; Ocón *et al.*, 2014). Par exemple, pendant les périodes automnale, hivernale et printanière, la population moyenne présente dans l'air était de l'ordre de 1 000 UFC/m³ d'air alors que durant l'été cette population augmente pour atteindre 2 800 UFC/m³ d'air (Ocón *et al.*, 2014). L'influence de l'itinéraire de vinification sur la population de moisissures et champignons dans l'air de la cave a également été suggérée. Une comparaison des populations des moisissures et champignons présentes dans l'air a été réalisée entre douze caves différentes et a révélé des différences en termes de population cultivable. En effet, une population cultivable plus élevée (2 547 UFC/m³ d'air) a été observée

dans l'air des caves où les fermentations sont conduites sans utilisation de SO₂ par rapport aux caves où les fermentations sont conduites avec SO₂ (771 UFC/m³ d'air) (Simeray *et al.*, 2001). De plus, en termes d'abondance relative, les auteurs mettent en évidence que les genres *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Penicillium* sont les genres les plus abondants dans l'air des caves où les fermentations sont conduites sans utilisation de SO₂.

2.2 Par les méthodes NGS

Par technique NGS (Illumina Mi-Seq), une seule étude a décrit la biodiversité microbienne au niveau du sol et des fûts dans une petite cave expérimentale (capacité maximale de 8 fûts) (Bokulich *et al.*, 2013a). Différents genres microbiens ont été décrits pour la première fois dans l'environnement de la cave : les espèces levuriennes *Aureobasidium pullulans*, *H. uvarum*, *Rhodotorula slooffiae* et *R. glutinis* ont été identifiées au niveau des fûts (surface interne et/ou externe) et l'espèce *Starmerella bacillaris* au niveau du sol. De plus, pour la première fois, des genres de moisissures et champignons (*Alternaria*, *Aspergillus* et *Wallemia*) et de bactéries (*Brevundimonas*, *Methylobacterium*, *Oenococcus*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Shewanella* et *Sphingomonas*) ont été décrits sur ces deux environnements.

Au regard du nombre très faible d'études réalisées sur la biodiversité des populations microbiennes dans l'environnement d'une cave d'élevage, d'autres études seraient nécessaires dans le but de mieux connaître la biodiversité mais aussi de comprendre la dynamique et l'évolution de ces populations au cours du temps et plus particulièrement des flores d'altération. En effet, étant donné la présence et la capacité de la levure *B. bruxellensis* à se développer dans le vin au cours de l'élevage (Chatonnet *et al.*, 1992) et la récurrence des contaminations dans l'environnement de caves, il apparaît nécessaire de multiplier les études sur la dynamique de cette levure dans le but de pouvoir la matiser et/ou l'éliminer.

3. Quid d'une nouvelle cuverie/cave ?

Depuis le début du 21^{ème} siècle, le nombre de nouvelles constructions viticoles n'a cessé d'augmenter au niveau international et particulièrement en Europe. En effet, d'après le rapport publié par la commission européenne, le nombre de nouvelles cuveries a doublé entre les années 1999 (1 412 881) et 2015 (2 484 963) (Bruyas, 2003 ; Eurostat, 2015).

Cependant, seulement trois études ont été réalisées au sein de nouvelles cuveries (Constantí *et al.*, 1997 ; Beltran *et al.*, 2002 ; Clavijo *et al.*, 2011b). Mais, les travaux entrepris par ces études

se sont focalisés sur l'effet de l'utilisation de souches commerciales de *S. cerevisiae* sur la diversité des populations levuriennes présentes pendant la FA. Les résultats de ces études démontrent que l'utilisation d'une souche commerciale de *S. cerevisiae*, dans une nouvelle cuverie depuis le premier millésime, influence la biodiversité et la composition des flores levuriennes non-*Saccharomyces* présentes dans les moûts et les vins (Constantí *et al.*, 1997) ainsi que la diversité et l'abondance des souches indigènes *S. cerevisiae* (Beltran *et al.*, 2002). De plus, l'impact de l'utilisation de souches commerciales de *S. cerevisiae* a également été observé au cours des FA de millésimes suivants suggérant la capacité des souches commerciales à devenir une flore résidante de l'environnement de la cuverie (Constantí *et al.*, 1997 ; Clavijo *et al.*, 2011b).

Cependant, aucun de ces travaux n'a été réalisé dans une nouvelle cuverie n'utilisant pas de starters levuriens, ni dans une nouvelle cave. De plus, jamais la biodiversité microbienne présente sur les WREs d'une nouvelle cuverie/cave n'a été décrite alors que de nombreux questionnements sont posés par la filière viti-vinicole afin de comprendre comment une flore résidante de cuverie/cave s'établit et évolue au cours du temps.

Partie 3 : Mécanismes et facteurs contribuant à la survie et à la persistance des populations fongiques dans les environnements reliés au vin

Dans les paragraphes précédents, la persistance de flores au sein des cuveries et l'implication de flores résidantes au cours des futures FA ont été décrites. Différents mécanismes développés par les microorganismes peuvent contribuer à leur persistance et/ou à leur implantation dans un environnement donné. De plus, l'influence de facteurs biotiques et abiotiques et les interactions entre microorganismes peuvent également contribuer à la persistance de certaines populations dans l'environnement.

1. Les interactions fongiques

1.1 Généralités

Les interactions fongiques peuvent être séparées en (i) interactions directes ou « cell-cell contact » si un contact physique est impliqué entre deux microorganismes et en (ii) interactions indirectes par la présence de métabolites extracellulaires (**Fig. 8**).

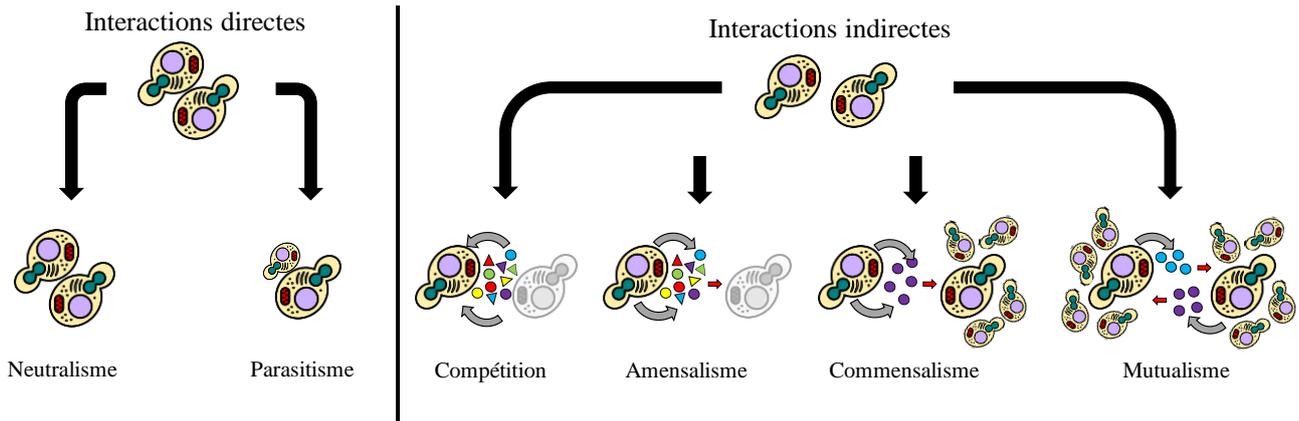


Figure 8 : Les différentes interactions directes et indirectes connues entre microorganismes.

(source personnelle)

Concernant la filière viti-vinicole, le neutralisme et le parasitisme sont les principales interactions directes décrites dans la littérature. En ce qui concerne les interactions indirectes, il s’agit du commensalisme et du mutualisme (interactions positives), ainsi que la compétition et l’amensalisme (interactions négatives) (Odum, 1959 ; Alexandre *et al.*, 2004 ; Dicks *et al.*, 2009 ; Ciani *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2017). Dans cette partie seront développées uniquement la compétition et l’amensalisme, interactions les plus décrites à l’heure actuelle chez les populations fongiques (particulièrement chez les levures). Ces interactions peuvent être influencées par un certain nombre de facteurs abiotiques (pH, température, éthanol, pression osmotique, azote, SO₂) et biotiques (diversité microbienne, cell-cell contact) (Ciani *et al.*, 2016) (Fig. 9).

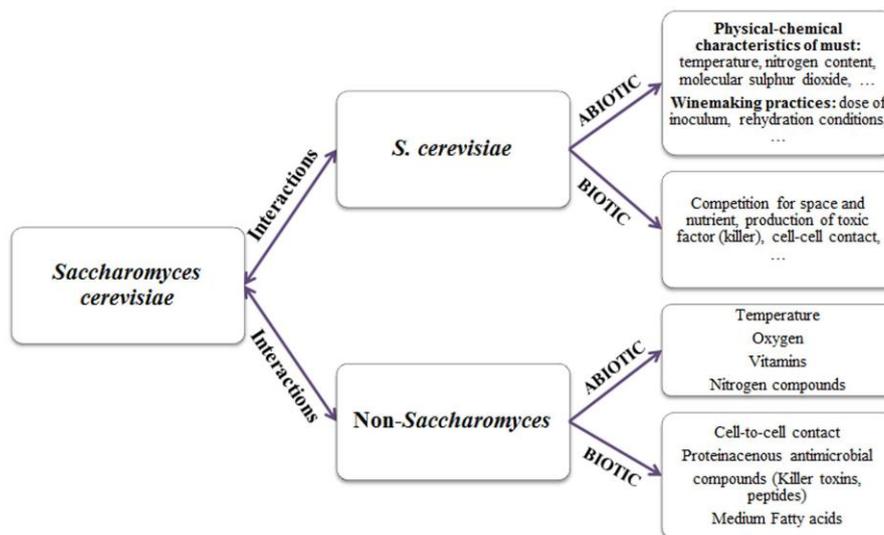


Figure 9 : Facteurs biotiques et abiotiques contribuant aux interactions entre levures.

(d’après Ciani *et al.*, 2016)

1.2 La compétition

En règle générale, la compétition est définie par la concurrence de deux populations microbiennes pour un ou plusieurs substrats présents dans le milieu, ce qui entraîne le développement d'une seule population au détriment de l'autre (Odum, 1959).

La compétition pour les nutriments (vitamines, azote et acides aminés) a été mise en évidence entre plusieurs levures œnologiques (*Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*) au cours de la FA (Bataillon *et al.*, 1996 ; Rollero *et al.*, 2018).

Au niveau des vitamines, Ough et ses collaborateurs (1989) ont mis en évidence une diminution de l'activité fermentaire et de la croissance de plusieurs souches de *S. cerevisiae* résultant de l'ajout de faibles concentrations ou même l'élimination totale des vitamines (biotine et pantothénate) du milieu de culture. Ce résultat suggère donc que la compétition pour les vitamines peut être un des facteurs conduisant à des fermentations alcooliques languissantes. Cette hypothèse a été validée par les travaux de Bataillon et ses collaborateurs (1996) qui ont montré, en conditions de vinification, que *H. uvarum* est capable de consommer les vitamines plus rapidement que *S. cerevisiae*, entraînant ainsi une faible croissance de *S. cerevisiae* et donc une fermentation alcoolique très languissante. De même, la consommation rapide des vitamines induisant une croissance plus lente de *S. cerevisiae* a été mise en évidence pour les espèces *Hanseniaspora viniae* et *M. pulcherrima* (Medina *et al.*, 2012).

En dehors de la compétition pour les vitamines, on peut citer la compétition pour l'azote qui a été mise en évidence entre *S. cerevisiae* et différentes espèces non-*Saccharomyces* (*Hanseniaspora viniae*, *M. pulcherrima* et *T. delbrueckii*), lorsque la concentration en azote devient faible (< à 176 mg/L d'azote assimilable) (Medina *et al.*, 2012 ; Taillandier *et al.*, 2014). La compétition pour l'ammonium et certains acides aminés a également été décrite entre *S. cerevisiae* et *Kluveromyces marxianus* ainsi qu'entre *S. cerevisiae* et *Zygoascus meyeriae* (Rollero *et al.*, 2018).

1.3 L'amensalisme

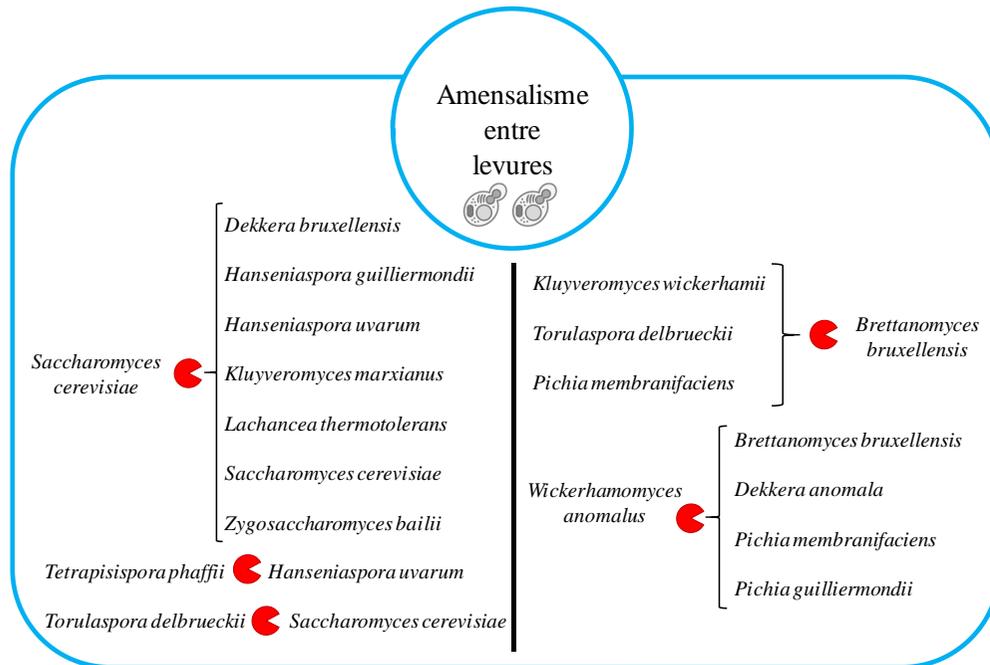
L'amensalisme se définit comme une interaction négative : un composé est produit par une population ayant un effet négatif sur l'activité métabolique d'une autre population (Odum, 1959). De nombreuses interactions d'amensalisme ont été décrites dans la filière viti-vinicole entre les différentes populations fongiques (**Fig. 10**).

1.3.1 Amensalisme entre levures

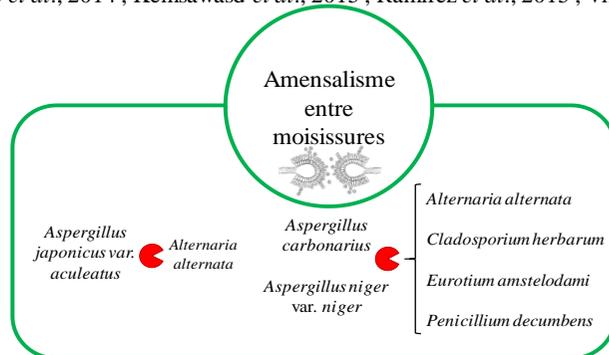
La production de protéines extracellulaires nommées « protéines killer » chez l'espèce *S. cerevisiae* est l'interaction d'amensalisme la plus étudiée (Bevan et Makover, 1963 ; Shimizu, 1993 ; Todd *et al.*, 2000). Ainsi, la production de toxines killer (K1, K2 et K28) par *S. cerevisiae* a été démontrée (Woods et Bevan, 1968 ; Young, 1987 ; Van Vuuren et Jacobs, 1992). En raison de la grande diversité intraspécifique de cette espèce, trois catégories de souches ont été identifiées : (i) les souches sensibles, inhibées par les toxines killer et n'en produisant pas (Woods *et al.*, 1974), (ii) les souches neutres, résistantes aux toxines killer mais n'en produisant pas et (iii) les souches killer qui, en plus de résister aux toxines des autres levures, en produisent également (Young et Yagiu, 1978). La production de toxines peut entraîner non seulement l'inhibition de différentes souches de l'espèce *S. cerevisiae* mais également de plusieurs espèces non-*Saccharomyces*. En effet, l'action antagoniste de *S. cerevisiae* a été décrite contre les espèces *B. bruxellensis* (Branco *et al.*, 2014), *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *T. delbrueckii* (Albergaria *et al.*, 2010), *H. guilliermondii*, *H. uvarum* (Pérez-Nevado *et al.*, 2006), *L. thermotolerans* (Kemsawasd *et al.*, 2015), *Dekkera anomala* et *Z. bailii* (Fernández de Ullivarri *et al.*, 2014).

Le phénomène killer a été décrit comme étant le facteur principal contribuant à la succession de souches de *S. cerevisiae* au cours de la FA (Pérez *et al.*, 2001 ; Pommier *et al.*, 2005) et à leur persistance potentielle sur le matériel vinicole (Sangorrín *et al.*, 2007).

La capacité à produire des toxines killer a également été mise en évidence pour des genres levuriens non-*Saccharomyces* comme *Candida* spp., *Pichia* spp., *Hanseniaspora* spp. (Fleet et Heard, 1993) et d'espèces telles que *Kluyveromyces wickerhamii*, *Debaryomyces vanriji*, *Pichia vanriji* (Bussey, 1981), *Kluyveromyces phaffii* (Comitini et Ciani, 2010), *T. delbrueckii* (Ramírez *et al.*, 2015) et *W. anomalus* (Fernández de Ullivarri *et al.*, 2014). De la même manière que pour l'espèce *S. cerevisiae*, la production de toxines killer pourrait ainsi contribuer à la persistance des levures non-*Saccharomyces* (*Cr. albidus*, *H. uvarum*, *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* et *Wickerhamomyces*) dans l'environnement des cuveries (Sangorrín *et al.*, 2007). Une activité killer contre l'espèce *B. bruxellensis* a particulièrement été soulignée pour les espèces *M. pulcherrima* (Sipiczki, 2006 ; Oro *et al.*, 2014), *P. membranifaciens* (Santos *et al.*, 2009), *T. delbrueckii* (Villalba *et al.*, 2016) et *W. anomalus* (Comitini *et al.*, 2004).



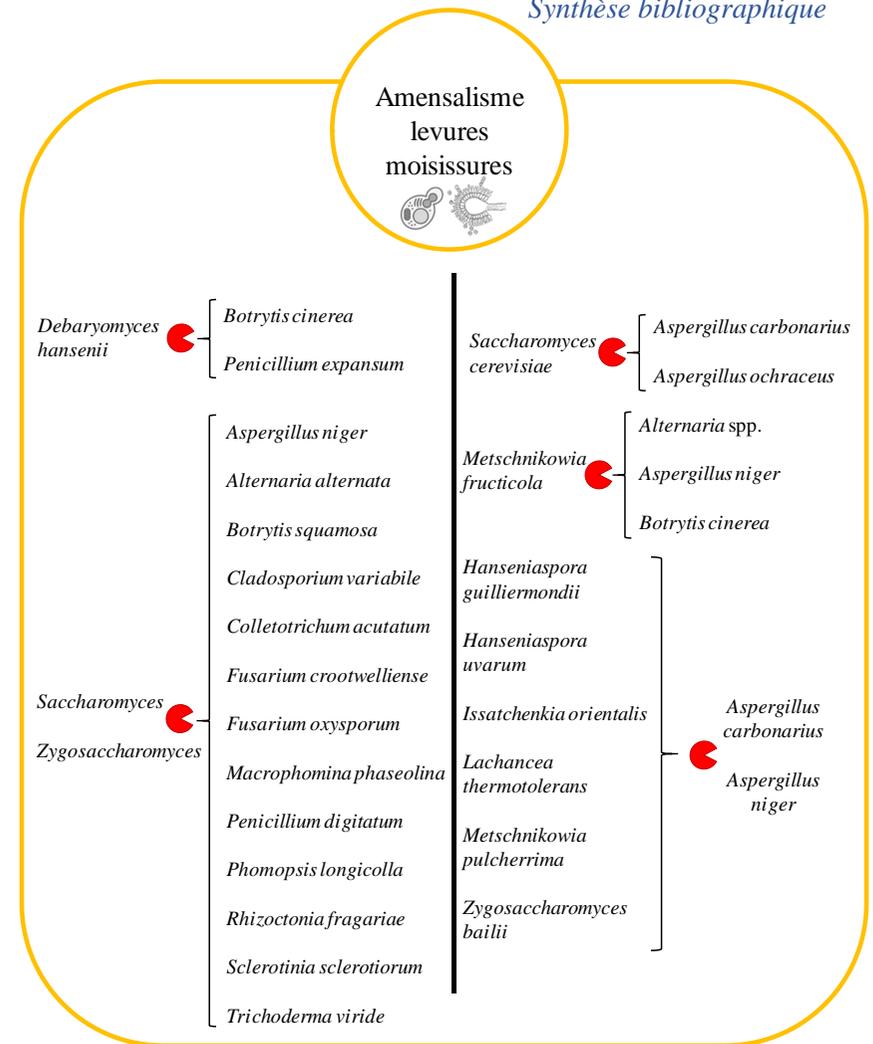
(Bussey, 1981 ; Fleet et Heard, 1993 ; Comitini *et al.*, 2004 ; Pommier *et al.*, 2005 ; Pérez-Navado *et al.*, 2006 ; Sipiczki, 2006 ; Sangorrín *et al.*, 2007 ; Santos *et al.*, 2009 ; Türkel et Ener, 2009 ; Albergaria *et al.*, 2010 ; Comitini et Ciani, 2010 ; Branco *et al.*, 2014 ; Fernández de Ullivarri *et al.*, 2014 ; Oro *et al.*, 2014 ; Kemsawasd *et al.*, 2015 ; Ramírez *et al.*, 2015 ; Villabla *et al.*, 2016)



(Valero *et al.*, 2007)

Figure 10 : Amensalisme entre les différentes populations fongiques (Activité d'amensalisme).

(source personnelle)



(Lafon-Lafourcade, 1984 ; Ribéreau-Gayon, 1985 ; Chalutz, 1988 ; Suzzi *et al.*, 1995 ; Karabulut *et al.*, 2003 ; Bleve *et al.*, 2006 ; Ponsone *et al.*, 2011 ; Cubaiu *et al.*, 2012 ; Kapetanakou *et al.*, 2012)

1.3.2 Amensalisme entre moisissures

Les interactions d'amensalisme entre moisissures sont peu étudiées (**Fig. 10**). A l'heure actuelle, seule l'activité antagoniste du genre *Aspergillus* a été mise en évidence contre des genres isolés des baies de raisin (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Eurotium* et *Penicillium*). Cette activité est variable en fonction des espèces et des souches d'une même espèce (Valero *et al.*, 2007). Cependant, bien que la nature des métabolites extracellulaires impliqués n'ait pas été identifiée, les auteurs démontrent que les facteurs abiotiques comme la température et l'activité de l'eau (a_w) semblent influencer le niveau d'antagonisme chez certaines espèces (Valero *et al.*, 2007).

1.3.3 Amensalisme levures-moisissures

L'amensalisme levures-moisissures a été étudié dans le but de contrôler (biocontrôle, Sharma *et al.*, 2009) le développement de moisissures présentes sur les baies de raisin dont le développement est souvent associé à la production de mycotoxines ou de déviations organoleptiques du vin (Correia, 2011 ; Rousseaux *et al.*, 2014 ; Paterson *et al.*, 2018). Les genres *Debaryomyces* (Chalutz *et al.*, 1988), *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* (Suzzi *et al.*, 1995 ; Cubaiu *et al.*, 2012), *Metschnikowia* (Karabulut *et al.*, 2003), *Lachancea* (Bleve *et al.*, 2006 ; Ponsone *et al.*, 2011) et *Hanseniaspora* (Kapetanakou *et al.*, 2012) ont été décrits comme étant capables de limiter la croissance des genres *Alternaria*, *Aspergillus* et *Penicillium*.

Botrytis cinerea, l'agent responsable de la pourriture grise, a été décrit comme ayant une activité antagoniste contre certaines levures. Ainsi, le développement excessif de *B. cinerea* sur les baies de raisin induit la production de substances acétigènes diminuant la croissance de certaines levures dans les moûts de raisin (Lafon-Lafourcade 1984 ; Ribéreau-Gayon, 1985). D'autres études démontrent que les genres *Debaryomyces* (Chalutz *et al.*, 1988) et *Metschnikowia* (Karabulut *et al.*, 2003) présentent une activité antagoniste inhibant le développement de *B. cinerea* sur les baies de raisin.

Ainsi, la persistance des populations microbiennes dans l'environnement pourrait être due à la compétition et l'amensalisme. En effet, au sein d'un consortium microbien complexe, un microorganisme avec une capacité d'antagonisme ou de compétition est vraisemblablement capable de se développer au profit des autres microorganismes présents et par conséquent de persister par la suite. Toutefois, de nombreux questionnements se posent quant à l'implication

de ces interactions vis-à-vis de la persistance des microorganismes dans les environnements (WREs) de cuverie et/ou de cave.

1.4 Quorum sensing

Ce phénomène a été évoqué pour la première fois dans la filière viti-vinicole, chez l'espèce *S. cerevisiae* (Bisson, 1999). Le « Quorum Sensing » (QS) est défini comme un mécanisme de communication cellulaire impliquant des molécules signal. Plusieurs molécules signal produites par *S. cerevisiae* ont été décrites : l'hydrogénocarbonate (Ohkuni *et al.*, 1998), l'acétaldéhyde (Richard *et al.*, 1996 ; Cheraiti *et al.*, 2005), l'ammonium (Palková *et al.*, 1997), le 2-phényléthanol, le tryptophol et le tyrosol (Chen et Fink, 2006). Récemment, la production de molécules signal, particulièrement le 2-phényléthanol, le tryptophol et le tyrosol, a été mise en évidence pour les espèces *H. uvarum*, *Torulaspora pretoriensis* et *Z. bailii* (Zupan *et al.*, 2013).

2. Mécanismes d'adaptation à l'environnement

2.1 Métabolisme levurien

Les levures se développent grâce à une grande variété de nutriments (carbone, azote, phosphore ...) utilisés comme sources d'énergie, permettant également la production de biomasse (Conway *et al.*, 2012). Cependant, la disponibilité des nutriments dans le milieu affecte fortement les capacités de croissance des levures. Ainsi, selon les nutriments disponibles, les levures ont la capacité d'adapter leurs besoins nutritionnels (Gray *et al.*, 2004). Cette adaptation se manifeste par le changement du taux de croissance des levures et par conséquent la durée du cycle cellulaire (Brauer *et al.*, 2008). De plus, les levures peuvent également ajuster leur métabolisme en fonction de la disponibilité des nutriments. En règle générale, si l'apport de nutriments (glucose) est stable, les levures possèdent soit un métabolisme respiratoire en présence d'oxygène (production de biomasse et de CO₂) soit un métabolisme fermentaire en absence d'oxygène (production d'éthanol) (Fritsche, 1972). Cependant, une fois que l'apport en glucose dépasse un certain seuil, les levures subissent une bascule métabolique (effet Crabtree) permettant de garder un métabolisme fermentaire (production d'éthanol) même en présence d'oxygène (Crabtree, 1929). Ce phénomène a particulièrement été décrit chez les espèces *S. cerevisiae* (De Deken, 1966) et *B. bruxellensis* (Rozpędowska *et al.*, 2011).

La levure *S. cerevisiae* présente des besoins carbonés et azotés plus élevés en comparaison avec d'autres espèces levuriennes. En conditions de vinification, le métabolisme de *S. cerevisiae* dépend de la composition en sucres et la concentration en azote assimilable des moûts (Henschke et Jiranek, 1993 ; Pinu *et al.*, 2014). En effet, les études démontrent qu'une large gamme de sucres présents dans les moûts (fructose, galactose, maltose, mannose, raffinose et sucrose) est fermentescible par l'espèce *S. cerevisiae* (Daran-Lapujade *et al.*, 2004, Fugelsang et Edwards, 2007). Il est à noter que ces besoins semblent être souche dépendants. En effet, des différences de performances fermentaires sont observées entre des souches commerciales de *S. cerevisiae* pour une même concentration initiale en azote (Manginot *et al.*, 1998). En ce qui concerne les besoins et l'assimilation en azote, une concentration de 140 mg d'azote assimilable/L est nécessaire pour le développement de cette espèce (Jiranek *et al.*, 1995). Certaines souches de *S. cerevisiae* possèdent des besoins azotés deux fois plus élevés que d'autres pour maintenir la même vitesse de fermentation (Julien *et al.*, 2000). Ainsi, les souches peuvent être classées en trois catégories : faiblement, moyennement ou fortement exigeantes en azote.

La composition en sucres et la concentration en azote assimilable dans le moût sont des facteurs conditionnant non seulement le développement de *S. cerevisiae* mais également les levures non-*Saccharomyces* (Andorrá *et al.*, 2010 ; Gobert *et al.*, 2017). Cependant, certaines de ces levures, moins exigeantes, sont peu sensibles aux variations de ces nutriments dans le moût. C'est le cas de *B. bruxellensis* qui possède un métabolisme anaérobie facultatif et Carbtree positif (Hellborg et Piškur, 2009). En comparaison avec l'espèce *S. cerevisiae*, *B. bruxellensis* ne présente pas d'exigences nutritionnelles élevées pour sa croissance (Suárez *et al.*, 2007). En effet, une concentration de 60 mg d'azote aminé/L est suffisante pour sa croissance (Guilloux-Bénatier *et al.*, 2001). Récemment, il a été décrit que la consommation des sucres chez *B. bruxellensis* était souche dépendante (Cibrario, 2017). Ces différentes capacités de développement décrites chez la levure d'altération *B. bruxellensis* pourraient contribuer, en partie, à sa persistance dans l'environnement de cuveries et/ou caves, milieu pauvre en nutriments.

Les nutriments représentent non seulement comme substrats de croissance, mais agissent aussi comme signaux de croissance, jouant ainsi un rôle important dans la capacité des levures à persister dans leur environnement. En effet, les nutriments servent de signaux dictant les programmes métaboliques et transcriptionnels permettant la survie des levures (Broach,

2012). A titre d'exemple, en cas de carence en azote associée à une présence de fortes concentrations en sucres, la réponse adaptative de *S. cerevisiae* se fait principalement *via* la régulation de l'expression de gènes et l'induction ou répression de certaines voies métaboliques (Backhus *et al.*, 2001 ; Erasmus *et al.*, 2003).

La capacité des levures à survivre et persister dans un environnement peut également être liée à leur appartenance à la classe des basidiomycètes ou des ascomycètes. En effet, Fleet *et al.* (2002) indiquent que, dans des conditions environnementales défavorables, une prédominance des levures à métabolisme respiratoire (classe des basidiomycètes) est observée par rapport aux levures fermentaires (classe des ascomycètes).

2.2 Le changement de morphologie

Dans des environnements carencés en nutriments, certaines espèces levuriennes disposent d'une stratégie d'adaptation particulière *via* le changement de la morphologie des cellules. Ce changement se manifeste par une croissance filamenteuse/hyphale (nommée pseudo-mycélium) : les cellules adoptent alors une forme cellulaire allongée avec un bourgeonnement distal et unipolaire. Suite au bourgeonnement, les cellules restent attachées par la cytokine, ce qui entraîne la formation de longues chaînes de cellules.

Cette stratégie d'adaptation est décrite pour l'espèce *Candida albicans*, pathogène opportuniste qui se développe dans les muqueuses des êtres humains et dont la virulence est liée à ce mode de croissance (Brown *et al.*, 1999 ; Giusani *et al.*, 2002). Cette croissance filamenteuse a également été décrite chez différentes espèces de levures œnologiques. En effet, suite à un épuisement nutritionnel (azote et glucose), l'espèce *S. cerevisiae* présente un changement de morphologie au niveau des cellules entraînant une croissance filamenteuse sur milieu de culture (Gimeno *et al.*, 1992 ; Roberts et Fink, 1994 ; Cullen et Sprague, 2000 ; Chow *et al.*, 2019). Indépendamment de l'état de ploïdie de *S. cerevisiae* (Dickinson, 2008), ce mode de développement est régulé par différentes voies de signalisation dont la voie MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), RAS/PKA (Rat Sarcoma/Protein Kinase A), SNF (Sucrose Non Fermentable) et TOR (Target Of Rapamycin) (Cullen et Sprague, 2012).

La croissance filamenteuse a également été décrite chez différentes espèces non-*Saccharomyces* telles que *B. bruxellensis* (Aguilar Uscanga *et al.*, 2000 ; Echeverrigaray *et al.*, 2013 ; Vigentini *et al.* 2013), *Schizosaccharomyces pombe* (Amoah-Buahin *et al.*, 2005), *P. guilliermondii* (Echeverrigaray *et al.*, 2013) et *Yarrowia lipolytica* (Szabo, 1999).

L'exposition des cellules au SO₂ pourrait être un facteur induisant le changement de morphologie, mais des résultats contradictoires ont été obtenus (Vigentini *et al.*, 2013 ; Louw *et al.* 2016).

2.3 La capacité à sporuler

La sporulation chez les levures se déroule en trois grandes étapes (**Fig. 11**). Au cours de la première division méiotique, les SPBs (Spindle Pole Bodies), structures encastrées dans l'enveloppe nucléaire ayant la même fonction que les centromères, deviennent des sites de formation pour les membranes des prospores (i). Ensuite, au cours de la deuxième division méiotique, les membranes des prospores se dilatent et englobent les noyaux haploïdes en formation (ii). Finalement, ces membranes se ferment sur elles-mêmes ainsi que la membrane de la cellule mère induisant la formation d'un asque contenant quatre spores matures (iii).

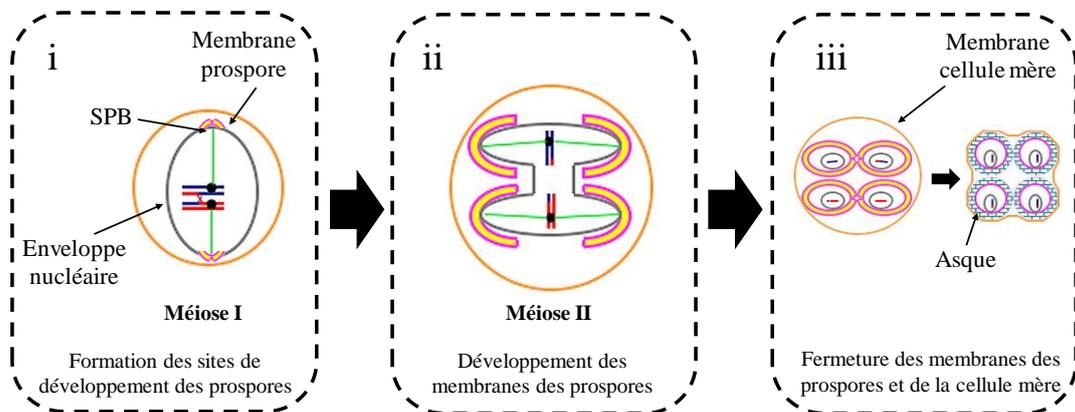


Figure 11 : Les différentes étapes de sporulation chez les levures.

(adapté de Neiman, 2011)

En cas d'absence totale de sources azotées et carbonées fermentescibles, les levures quittent leur cycle de division mitotique (reproduction asexuée) et rentrent en méiose (reproduction sexuée) leur permettant de sporuler (Esposito et Klapholz, 1981). La germination des spores a été décrite pour les espèces œnologiques *S. cerevisiae* (Ramírez *et al.*, 1998 ; Ambrona et Ramírez, 2007) et *T. delbrueckii* (Albertin *et al.*, 2014b), notamment en conditions de stress nutritionnels (carence en sources carbonées et azotées). Cependant, très peu d'études existent à l'heure actuelle sur le rôle de la sporulation comme mécanisme de persistance des microorganismes dans l'environnement. Seuls, Knight et Goddard (2016) ont mis récemment en évidence que la sporulation de *S. cerevisiae* serait la stratégie permettant la survie de cette espèce dans le vignoble.

Outre la formation des spores par méiose (reproduction sexuée), certaines espèces levuriennes possèdent la capacité à former des spores-like en gardant le cycle de division par mitose (reproduction asexuée). Dans ce cas, le terme de chlamydo-spores est employé : ce sont des structures ressemblant aux spores mais qui possèdent une paroi plus épaisse et une taille supérieure à celle des spores. La présence des chlamydo-spores a été mise en évidence pour certaines espèces de levures pathogènes comme *C. albicans* (Staib et Morschhäuser, 2007) et *Cryptococcus neoformans* (Lin et Heitman, 2005). Ces structures, généralement associées à la croissance hyphale, sont issues de cellules nommées « suspensor » situées à l'extrémité des cellules filamenteuses (Martin *et al.*, 2005). Bien que la croissance filamenteuse ait été démontrée pour plusieurs espèces levuriennes isolées de la filière viti-vinicole (paragraphe 2.2), la présence de chlamydo-spores n'a pas encore été mise en évidence.

2.4 L'état VNC

Certains microorganismes sont capables de rentrer dans un état viable non-cultivable (VNC) permettant de résister aux conditions environnementales difficiles. Cet état a tout d'abord été décrit pour des espèces bactériennes (*Escherichia coli* et *Vibrio cholerae*) qui présentaient des cellules toujours viables mais dans l'incapacité de se multiplier sur un milieu nutritif gélosé (Xu *et al.*, 1982). Suite à cette découverte, des travaux ont été réalisés pour mieux caractériser cet état. Ainsi, par définition, des cellules VNC doivent (i) conserver une activité métabolique, (ii) préserver une intégrité membranaire, (iii) être incapables de former des colonies sur milieu gélosé (Yamamoto, 2000) et (iv) être capables de ressortir de cet état et reprendre ainsi une capacité à croître : on parle donc de « ressuscitation » (Whitesides et Oliver, 1997). La sortie de l'état VNC est souvent déclenchée par l'élimination du stress qui initialement a provoqué l'entrée des cellules dans cet état (Oliver, 2005).

Chez les levures, cet état a été décrit pour l'espèce d'intérêt *S. cerevisiae* (Salma *et al.*, 2013) et les espèces d'altération *B. bruxellensis* (Millet et Lonvaud-Funel, 2000 ; Serpaggi *et al.*, 2012) et *Z. bailii* (Divol et Lonvaud-Funel, 2005). Concernant *S. cerevisiae* et *B. bruxellensis*, les études démontrent que l'entrée en état VNC est provoquée par (i) la carence nutritionnelle, (ii) le manque d'oxygène et (iii) l'ajout de sulfites (du Toit *et al.*, 2005 ; Agnolucci *et al.*, 2010 ; Serpaggi *et al.*, 2012 ; Salma *et al.*, 2013 ; Zuehlke et Edwards, 2013 ; Longin *et al.*, 2016). Pour ces deux espèces, l'entrée dans l'état VNC est souche dépendant (Salma, 2013 ; Capozzi *et al.*, 2016).

2.5 Biofilms

Par définition, un biofilm est une communauté microbienne adhérente à une surface biotique ou abiotique et englobée dans une matrice autoproduite de substances polymériques extracellulaires (EPS). Les biofilms peuvent être constitués d'une ou plusieurs espèces microbiennes et se développent sur des interfaces solide/liquide ou liquide/air (Costerton *et al.*, 1978).

La formation de biofilms est un mécanisme complexe divisé en cinq étapes différentes (**Fig. 12**) (Lasa, 2006) :

1. Attachement réversible à la surface, ainsi que la création de ce qu'on appelle un film de conditionnement.
2. Adhésion des cellules de façon irréversible avec le début de production de substances polymériques extracellulaires (EPS).
3. Croissance et évolution de l'architecture du biofilm avec le développement de micro-colonies primaires.
4. Maturation du biofilm avec le développement des micro-colonies.
5. Détachement de colonies du biofilm et conditionnement de nouvelles surfaces.

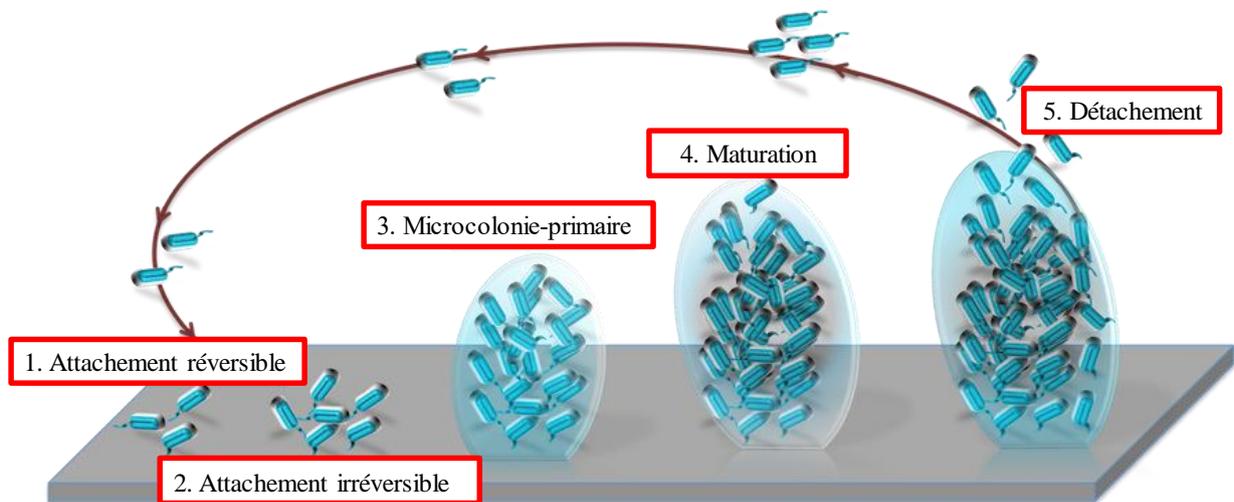


Figure 12 : Différentes étapes de développement d'un biofilm.

(adapté de Lasa, 2006)

Les premières études se sont intéressées à la caractérisation des biofilms bactériens, et plus particulièrement aux biofilms responsables d'infections en milieu hospitalier (dus à la résistance des microorganismes pathogènes aux antibiotiques) ainsi qu'aux biofilms

responsables d'altération des aliments dans les industries agroalimentaires (Bridier *et al.*, 2015 ; Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2019). Ces travaux ont permis de définir les différents éléments constituant un biofilm et d'étudier leurs fonctions. L'élément le plus important au sein d'un biofilm est la matrice EPS. En effet, cette matrice est produite au cours des différentes étapes de développement du biofilm et forme l'environnement dans lequel les cellules sont englobées et se multiplient. En plus des polysaccharides, cette matrice contient des glycoprotéines, de l'ADN extracellulaire (ADNe) et des glycolipides (Zarnowski *et al.*, 2014 ; Flemming, 2016). Les EPS assurent plusieurs fonctions au sein du biofilm telles que la rétention d'eau, le maintien de la structure, l'activité enzymatique, l'adhésion et la résistance aux stress (Flemming et Wingender, 2010). Cependant, ces différentes fonctions dépendent de la quantité d'EPS produite. En effet, les EPS sont produites en différentes quantités selon l'âge du biofilm, les nutriments présents et le type de microorganisme en question (Mayer *et al.*, 1999 ; Leriche *et al.*, 2000). Les résistances chimiques et physiques des biofilms ne sont pas dues uniquement à la production d'EPS mais également à la proximité des cellules entre elles. En effet, le rapprochement des cellules les unes des autres permet des échanges métaboliques renforçant leur adaptation aux conditions environnementales (O'Connell *et al.*, 2006 ; Coenye et Nelis, 2010 ; Møretrø et Langsrud, 2017). Les études des biofilms bactériens ont également révélé une complexité inattendue au niveau génétique. En effet, une multitude de gènes est impliquée à chaque étape du développement des biofilms. Certains gènes sont exprimés lors du passage des cellules du mode de vie planctonique au mode de vie biofilm (García-Sánchez *et al.*, 2004), alors que d'autres sont exprimés lors de la production des polysaccharides (Murillo *et al.*, 2005) ou encore durant la maturation du biofilm (Fanning et Mitchell, 2012). De plus, les connaissances actuelles indiquent que la formation des biofilms bactériens est contrôlée par des molécules du QS, le monophosphate de diguanosine bis-(3'-5')-cyclique (c-di-GMP) et de petits ARN (sRNAs) (Wolska *et al.*, 2016).

Bien que la majeure partie des études se soient focalisées sur les procaryotes, d'autres travaux ont montré que les eucaryotes, spécialement les levures, sont également capables de former des biofilms. Dans le secteur médical, de nombreux genres levuriens responsables de multiples infections chez l'être humain sont décrits comme capables de former des biofilms : *C. albicans* (Finkel et Mitchell, 2011), *Cr. neoformans* (Martinez et Casadevall, 2007) et *Trichosporon asahii* (Bonaventura *et al.*, 2006). En industrie agroalimentaire, les espèces *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Trichosporon faecale* et *Yamadazyma triangularis*, ont été identifiées au sein d'un biofilm formé sur du matériel de

laiterie (Stellato *et al.*, 2015). En brasserie, des biofilms des espèces *Candida parapsilosis*, *Candida pelliculosa*, *Candida pararugosa*, *Candida rugosa*, *Candida sake*, *D. hansenii*, *Debaryomyces occidentalis*, *Pichia anomala*, *S. cerevisiae* et *Yarrowia lipolytica* ont été identifiés (Timke *et al.*, 2004 ; Storgårds *et al.*, 2006 ; Timke *et al.*, 2008). La capacité de levures d'intérêt œnologique et/ou d'altération à former des biofilms a été décrite pour les espèces *B. bruxellensis*, *H. uvarum*, *P. guilliermondii*, *P. manshurica*, *Saccharomyces ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Wickerhamomyces anomalus* et *Z. bailii* (Joseph *et al.*, 2007 ; Tristezza *et al.*, 2010 ; Pu *et al.*, 2014 ; Kregiel *et al.*, 2018 ; Perpetuini *et al.*, 2018) ainsi que pour des souches indigènes et commerciales de l'espèce *S. cerevisiae* (Tristezza *et al.*, 2010 ; Tek *et al.*, 2018). La capacité d'adhésion de différentes souches commerciales de *S. cerevisiae* a été mise en évidence au niveau du matériel vinaire de cuverie (couche interne des tuyaux de transport des moûts/vins) (Tek *et al.*, 2018), suggérant que l'adhésion et le développement de *S. cerevisiae* en biofilms expliqueraient en partie la persistance de ces levures sur le matériel vinaire et leur implantation dans les fermentations futures. De plus, il a été suggéré que des souches de *S. cerevisiae* cultivées en laboratoire seraient susceptibles de perdre leurs capacités d'adhésion et de formation des biofilms du fait de leur culture régulière sur un milieu riche (Kuthan *et al.*, 2003). Chez *B. bruxellensis*, la croissance en biofilms a été observée sur diverses surfaces comme le polystyrène (Joseph *et al.*, 2007) et le verre (Kregiel *et al.*, 2018). Ce développement semble être favorisé par (i) une carence nutritionnelle, (ii) une faible accessibilité aux sources carbonées (Kregiel *et al.*, 2018) et/ou (iii) un pH bas (Joseph *et al.*, 2007). Tristezza *et al.* (2010) ont, quant à eux, observés une formation de biofilms plus importante dans le vin comparé à un milieu synthétique riche en nutriments. De plus, ces auteurs ont démontré que les cellules de *B. bruxellensis* et de *S. cerevisiae* contenues dans le biofilm possèdent une résistance plus élevée aux désinfectants utilisés en œnologie par comparaison à des cultures planctoniques. Cependant, un manque d'observations microscopiques ne permet pas de visualiser les structures tridimensionnelles et de valider la capacité de cette espèce à former des biofilms. A notre connaissance, seul Poupault (2015) démontre, par microscopie confocale, la capacité d'adhésion de différentes souches de *B. bruxellensis* sur polystyrène.

3. Facteurs influençant la persistance des microorganismes

Les conditions du milieu peuvent modifier le devenir des microorganismes dans l'environnement où ils se trouvent tels que des facteurs abiotiques (température, éthanol, pH)

ou des activités anthropiques (ensemencements microbiens, utilisation du SO₂ et d'agents de nettoyage).

3.1 Influence des facteurs abiotiques (température, éthanol, pH)

S. cerevisiae a été décrite comme capable de se développer et de maintenir une activité métabolique à des températures allant de 10 °C (Schade *et al.*, 2004) à 39,8 °C (Walsh et Martin, 1977). De plus, cette espèce est décrite comme tolérante à l'éthanol (des concentrations pouvant atteindre 117 g/L d'éthanol (14,9% v/v)) (Arroyo-López *et al.*, 2010). Cette tolérance à l'éthanol joue un rôle important dans la croissance séquentielle des souches de *S. cerevisiae* au cours de la fermentation, où les souches les plus tolérantes sont celles retrouvées à la fin de la FA (Torija *et al.*, 2003). Les souches de cette espèce sont également capables de se développer dans un milieu très acide (pH entre 3 et 3,5) tel que celui rencontré dans le vin (Charoenchai *et al.*, 1998). Associé à un métabolisme fermentaire anaérobie facultative hautement performant (Crabtree positif), l'ensemble de ces caractéristiques participe à la meilleure adaptation de *S. cerevisiae* aux conditions de vinification.

En ce qui concerne l'espèce *B. bruxellensis*, plusieurs études se sont intéressées à l'influence des paramètres physico-chimiques du vin sur le développement et la croissance de cette espèce. En effet, *B. bruxellensis* est décrite pour sa résistance aux variations importantes de température (entre 4 et 22 °C) tout en gardant un niveau de cultivabilité assez élevé (Conterno *et al.*, 2006 ; Zuehlke et Edwards, 2013). Récemment, Cibrario *et al.* (2019b) ont démontré que la capacité de *Brettanomyces bruxellensis* à se développer dans des conditions de températures variables participe à sa persistance dans l'environnement de la cave. De plus, la résistance de cette espèce à des températures basses (conditions retrouvées dans les WREs) est liée à l'activation de plusieurs voies de signalisation moléculaire (High Osmolarity Glycerol (HOG)), qui conduit à l'accumulation de glucides de réserve (Galafassi *et al.*, 2015). *B. bruxellensis* est également décrite comme résistante à l'éthanol (15% v/v) (Smith et Divol, 2016). Cette caractéristique est cependant fonction de la souche (Barata *et al.*, 2008 ; Conterno *et al.*, 2006). *Brettanomyces bruxellensis* est aussi décrite comme capable de se développer à des pH très bas (pH = 2) (Conterno *et al.*, 2006). Toutes ces capacités combinées peuvent contribuer à la persistance de *Brettanomyces bruxellensis* dans le vin et à la contamination récurrente au cours de millésimes consécutifs.

3.2 Influence des activités anthropiques

3.2.1 Ensemencements microbiens

La survie et la persistance des microorganismes dans l'environnement vinicole peuvent aussi être dépendantes des activités anthropiques telles que l'usage de starters. En effet, plusieurs études démontrent que l'ensemencement des moûts par des souches commerciales de *S. cerevisiae* a un impact sur l'abondance et la diversité des populations de levures non-*Saccharomyces* (Heard et Fleet, 1985 ; Egli *et al.*, 1998 ; Raspor *et al.*, 2002 ; Albertin *et al.*, 2014c ; Bagheri *et al.*, 2017) et de *S. cerevisiae* indigènes (Egli *et al.*, 1998). De plus, le levurage influencerait également la diversité des populations levuriennes des futures fermentations. En effet, Martiniuk *et al.* (2016) suggèrent que des souches commerciales de *S. cerevisiae*, devenues résidantes dans l'environnement de la cuverie, limitent le développement de la population indigène *S. cerevisiae* dans les moûts et au cours de la FA. Cependant, l'impact de l'ensemencement dépend de la souche commerciale utilisée et de son taux d'inoculation (Salvadó *et al.*, 2011).

Au niveau des WREs, Sangorrín *et al.* (2007) mettent en évidence un nombre plus faible d'isolats de *S. cerevisiae* (3 isolats) sur le matériel de cuveries ayant recours à des starters commerciaux, par rapport au matériel vinaire des cuveries n'en utilisant pas (23 isolats). Contrairement à cela, la proportion des espèces fermentatives non-*Saccharomyces* : *H. uvarum*, *L. thermotolerans* et *T. delbrueckii* était plus élevée sur le matériel vinaire des cuveries ayant utilisées des levures commerciales. Cependant, cette étude est la seule étude existante à l'heure actuelle sur ce sujet.

3.2.2 L'utilisation du SO₂

Le SO₂, particulièrement le SO₂ moléculaire, est utilisé pour ses différentes propriétés antioxydantes, antiseptiques et antioxydasiques. La majorité des études semble s'accorder sur une diminution, après sulfitage, de la cultivabilité et une modification de la diversité des espèces levuriennes d'intérêt (Constantí *et al.*, 1998 ; Cocolin et Mills, 2003 ; Takahashi *et al.*, 2014 ; Grangeteau *et al.*, 2016a, 2017), d'altération (Conterno *et al.*, 2006 ; Vincent, 2006) et des espèces bactériennes (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006 ; Bokulich *et al.*, 2015) présentes dans les moûts. Cependant, ces effets varient en fonction de la dose de SO₂ (du Toit *et al.*, 2005 ; Bokulich *et al.*, 2015) et des souches présentes (Nadai *et al.*, 2016). De ce fait, l'utilisation du SO₂ pourrait avoir une influence indirecte sur la persistance de populations microbiennes sur les WREs : les populations tolérantes au SO₂ seront plus susceptibles de se développer et donc

de se retrouver sur les WREs après FA. Cependant, à l'heure actuelle, peu de données sont disponibles à ce sujet.

3.2.3 L'utilisation d'agents de nettoyage

En dehors de l'utilisation du SO₂, différentes méthodes préventives (physiques et chimiques) sont mises en place pour réduire les risques de contamination des vins par des populations levuriennes (ex : *B. bruxellensis*) et bactériennes (bactéries acétiques) responsables de l'altération du vin (Lisanti *et al.*, 2019). Ces méthodes incluent l'embouteillage à chaud (protection vis-à-vis de l'O₂) pour éviter le développement des bactéries acétiques (Bartowsky et Henschke, 2008) ou le collage des vins à l'aide de protéines pour lutter contre les contaminations par *B. bruxellensis* (Murat et Dumeau, 2003). De plus, d'autres composés comme le chitosane (Bağder Elmacı *et al.*, 2015) et la β-glucanase (Enrique *et al.*, 2010) sont également utilisés pour contrôler le développement de *B. bruxellensis*. L'utilisation de ces techniques préventives semble influencer non seulement *B. bruxellensis*, mais également des espèces qui peuvent être présentes dans les moûts et/ou les vins. En effet, bien que le chitosane ne montre aucun impact sur la population de *S. cerevisiae* (Gómez-Rivas *et al.*, 2004), la croissance des espèces *H. uvarum* et *Oenococcus oeni* est complètement inhibée par ce dernier (Bağder Elmacı *et al.*, 2015).

Malgré l'utilisation de ces différentes méthodes préventives, les contaminations des vins par *B. bruxellensis* restent récurrentes et sont détectées aussi bien au cours de la FA que pendant les étapes post fermentaires. En effet, d'après Yap *et al.* (2007), l'augmentation des contaminations est notamment observée pendant l'élevage et elles sont liées à une mauvaise hygiène des caves. Ainsi, les vinificateurs essaient de renforcer le nettoyage du matériel vinaire et des fûts présents en cave dans le but de contrôler le développement de cette levure.

La désinfection du matériel vinaire en inox est réalisée selon une procédure bien définie impliquant l'utilisation de produits chimiques chlorés, alcalins ou à base d'acide peracétique (Duperoux, 2014). En effet, l'efficacité de l'acide peracétique et produits chlorés contre le développement de *B. bruxellensis* a déjà été mise en évidence dans la littérature (Tristezza *et al.*, 2010). Les produits chimiques (peroxyde d'hydrogène, acide peracétique, permanganate de potassium, eau oxygénée) peuvent également être employés pour la désinfection des fûts d'élevage. Cependant, des travaux ont montré que l'efficacité de ces produits contre *B. bruxellensis* est limitée en raison de la porosité du bois (Richard *et al.*, 2014). En effet,

B. bruxellensis peut être détectée à des profondeurs allant jusqu'à 6 à 8 mm dans le bois des fûts (Barata *et al.*, 2013).

Outre l'utilisation des produits chimiques, les fûts peuvent également être désinfectés par des traitements à la vapeur humide, l'ozone, les lumières UV, les radiations micro-ondes ou les ultrasons (Chatonnet, 2010 ; Guzzon *et al.*, 2011 ; Schmid *et al.*, 2011b). Les études montrent un effet positif de ces traitements pour l'élimination de la levure *B. bruxellensis* présente à la surface des fûts (Jiranek *et al.*, 2008 ; Schmid *et al.*, 2011b ; Guzzon *et al.*, 2017) et à des profondeurs de 2 à 4 mm (Schmid *et al.*, 2011b). Cependant, ces traitements puissants ont un impact négatif sur la persistance d'autres genres pouvant être présents dans les fûts. En effet, une forte diminution de l'abondance des espèces *Candida parapsilopsis*, *Candida ishiwadae* et *D. hansenii* a été mise en évidence à la surface interne des fûts après désinfection (Guzzon *et al.*, 2011).

En conclusion, l'intervention humaine, à travers l'utilisation d'agents de nettoyage pour renforcer l'hygiène des cuveries et caves, peut avoir un impact négatif sur les populations résidentes et créer des déséquilibres écologiques qui pourraient permettre à d'autres microorganismes, comme *B. bruxellensis*, de prendre l'avantage en colonisant la niche écologique laissée, et de s'installer et/ou persister dans l'environnement de la cave.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

1. Echantillonnage du matériel biologique

1.1 Nouvelle cuverie

1.1.1 Environnements de la cuverie

Des prélèvements ont été réalisés dans une nouvelle cuverie (1 000 m²) située à Nuits-Saint-Georges dans une zone industrielle (**Fig. 13**). Cette nouvelle cuverie a été opérationnelle pour la première fois en septembre 2016.

Trois environnements différents ont été étudiés : le sol, les murs et le matériel vinaire. Les prélèvements de ces environnements ont été réalisés avant l'arrivée de la récolte (T0) et 3 mois après la fin de la FA (T3) pour les millésimes 2016 et 2017 et uniquement à T0 pour le millésime 2018. Avant l'arrivée de la première récolte du millésime 2016, la majorité du matériel vinaire était neuf à l'exception de certaines cuves (36/108) qui avaient déjà été utilisées auparavant (**Fig. 13a**). Ainsi, à T0 2016, des prélèvements séparés ont été faits sur le matériel neuf et sur le matériel ancien (**Tableau 3**). Les prélèvements du matériel vinaire ont également été effectués au niveau des conquêts de réception, des pressoirs, des vannes et raccords en inox, des joints des cuves et des tapis roulants de réception.

Les prélèvements ont été effectués à l'aide d'écouvillons stériles en faisant des stries longitudinales et transversales à la surface du sol, des murs et du matériel de la nouvelle cuverie. Les surfaces prélevées pour chaque environnement sont présentées dans le **tableau 3**.

Au total, 40 prélèvements ont été réalisés par environnement et par temps de prélèvement (**Tableau 3**). Cependant, les prélèvements du sol et des murs de la cuverie ont été doublés pour les millésimes 2017 et 2018 (**Fig. 13b** et **Tableau 3**). Etant donné ce nombre conséquent et pour obtenir des échantillons moyens représentatifs de chaque environnement, les prélèvements ont été poolés (40 ou 80 écouvillons dans 40 ou 80 mL d'eau physiologique (NaCl à 0,9% w/v) respectivement) (**Tableau 4**).

Au total, 7 échantillons moyens (millésime 2016), 6 échantillons moyens (millésime 2017) et 3 échantillons moyens (T0 2018) ont été obtenus pour les trois environnements (sol, murs et matériel vinaire) (**Tableau 4**).

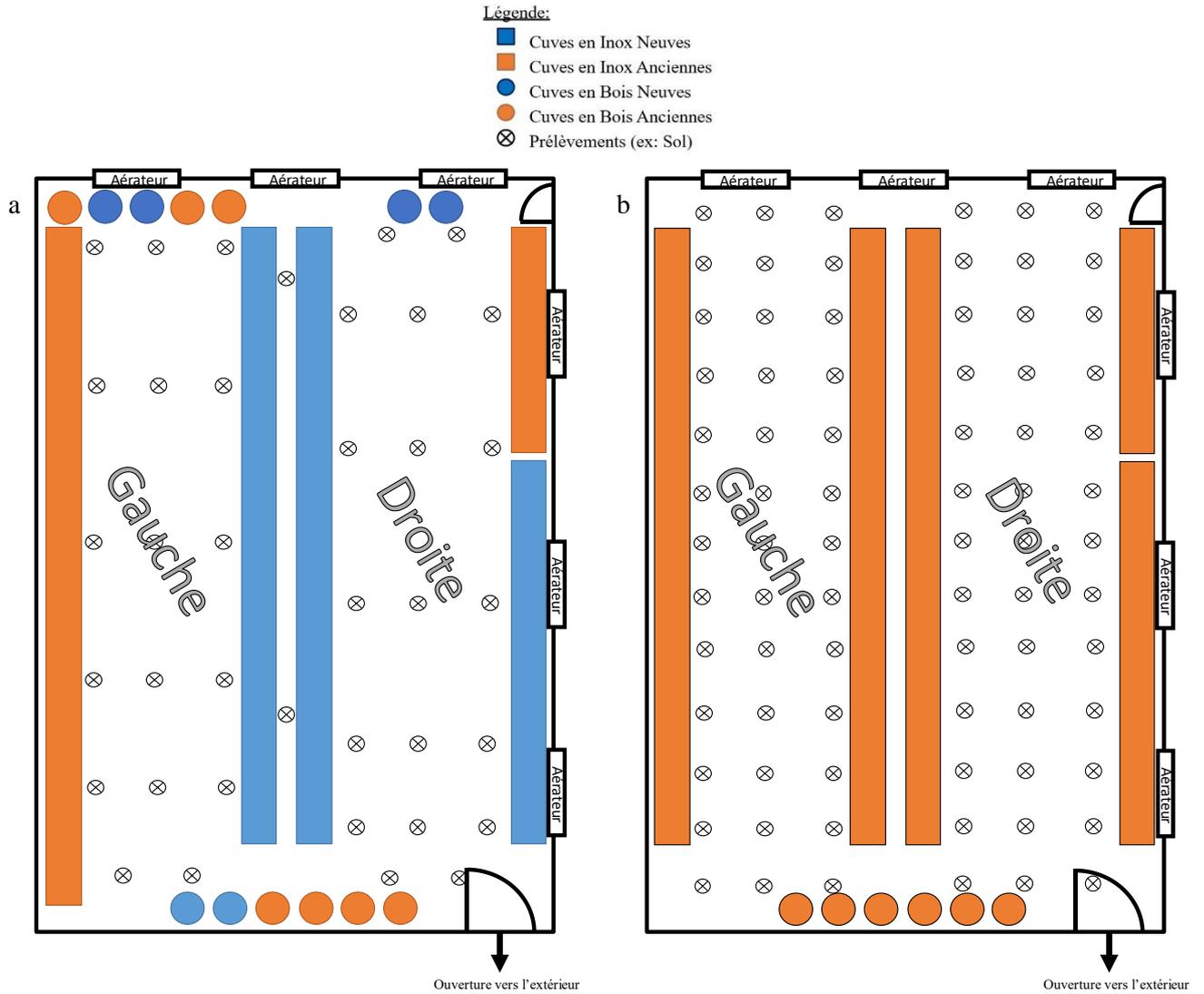


Figure 13 : Plan schématique de la nouvelle cuverie indiquant les prélèvements réalisés sur le sol pour le millésime 2016 (a) et pour les millésimes 2017 et 2018 (b).

Tableau 3 : Surfaces et nombre de prélèvements effectués sur les différents environnements de la nouvelle cuverie.

Environnement		Sol	Murs	Matériel	Total prélèvements
Surface de chaque prélèvement		1 000 cm ²	1 000 cm ²	4 cm ²	
Nombre de prélèvements par temps	T0 2016	40	40	40 (ancien) + 40 (neuf)	160
	T3 2016	40	40	40	120
	T0 2017	80	80	40	200
	T3 2017	80	80	40	200
	T0 2018	80	80	40	200

Tableau 4 : Nombre d'échantillons moyens obtenus sur les différents environnements de la nouvelle cuverie.

Environnement		Sol	Murs	Matériel	Total échantillons moyens
Nombre d'échantillons moyen par temps	T0 2016	1	1	1 (ancien) + 1 (neuf)	4
	T3 2016	1	1	1	3
	T0 2017	1	1	1	3
	T3 2017	1	1	1	3
	T0 2018	1	1	1	3

1.1.2 Moûts de raisin/vins

Au cours du millésime 2016, afin de s'assurer du départ en fermentation alcoolique des cuves, un pied de cuve (800 Kg) a été réalisé dans une ancienne cuverie localisée à Gevrey Chambertin. Trois prélèvements de moût de raisin (volume 50 mL) ont été réalisés au niveau du pied de cuve : avant l'addition du SO₂, 36 h après l'ajout de SO₂ (3 g/hL) et 7,5 j après l'ajout de SO₂.

Après le départ en fermentation alcoolique du pied de cuve (densité ≈1,091), celui-ci a été transporté dans la nouvelle cuverie, et a servi à l'ensemencement d'une cuve (code : A) contenant du moût de raisin provenant de la même parcelle que le pied de cuve (800 Kg pour 31 hL). Avant ensemencement de la cuve A avec le pied de cuve, un prélèvement de moût de raisin de la cuve A a été réalisé. Puis un prélèvement a été réalisé en fin de FA. Parallèlement, 2 autres cuves (code : B et C) non ensemencées ont été également suivies. Des prélèvements de moût de raisin/vin (volume = 50 mL) pour ces 2 cuves ont été réalisés à T0, ainsi qu'à la fin de la FA. Les prélèvements ont été réalisés au niveau du robinet de dégustation situé à la partie basse des cuves, robinet préalablement « nettoyé » en laissant couler quelques litres de liquide avant le prélèvement.

La même méthodologie d'échantillonnage a été suivie au cours du millésime 2017, sans réalisation de pied de cuve pour ce millésime. Les prélèvements (T0 et fin FA) ont été effectués pour 4 cuves différentes (code : A, B, B' et C) contenant du moût de raisin provenant des mêmes appellations suivies lors du millésime 2016.

1.2 Caves d'élevage en production

Trois caves (nommées B, PR et M), réparties sur le vignoble de la Côte d'Or (Fig. 14), ont été sélectionnées. Ces trois caves présentent différentes caractéristiques et itinéraires techniques (Tableau 5).

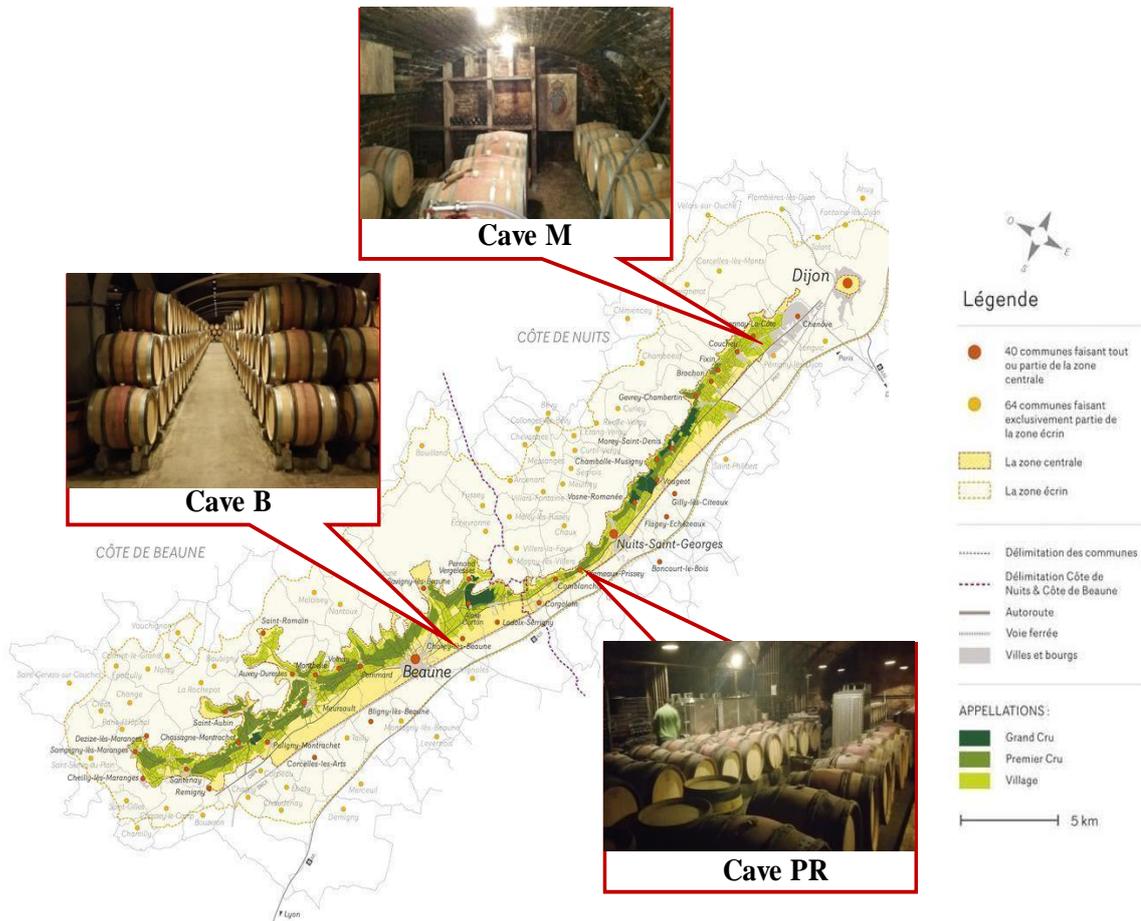


Figure 14 : Localisation géographique des trois caves d'élevage suivies dans le cadre de cette étude.

(adapté de : www.beaune-tourisme.fr et photos personnelles)

Tableau 5 : Caractéristiques des trois caves et itinéraires techniques suivis par les vinificateurs.

Modalités	Caves		
	B	PR	M
Surface de la cave	4 000 m ²	240 m ²	43 m ²
Nombre de fûts	3 200 (876*)	104	21
Contaminations par <i>Brettanomyces</i> lors des millésimes précédents	+	+/-	-
Hygiène	+++	+	+
Starters microbiens	Oui	Non	Starters et/ou flore indigène

* (la première année, l'étude a porté sur une partie de la cave à savoir 876 fûts correspondant aux millésimes 2015-2016)

Pour les trois caves, des prélèvements ont été réalisés sur le sol, les murs, le matériel vinaire (robinets, tuyaux, pipettes, seaux, cuves de transfert, ...) et sur l'extérieur des fûts. Des prélèvements ont été effectués durant les millésimes 2016 et 2017 au cours de la période d'entonnage et en début d'élevage à savoir : avant l'entonnage, à la fin de l'entonnage, 2, 4 et 8 mois après la fin de l'entonnage.

A l'aide d'écouvillons stériles, les prélèvements ont été réalisés en effectuant des stries à la surface du sol, des murs, du matériel et des fûts. La surface des prélèvements a varié en fonction de l'environnement et de la taille de chaque cave comme indiqué dans le **tableau 6**.

Un total de 20 prélèvements a été effectué par environnement et temps de prélèvement pour le millésime 2016 (**Tableau 6**). Pour le millésime 2017, le nombre de fûts entonnés a été plus important : le millésime 2017 a été un millésime normal en volume comparé au millésime 2016, millésime marqué par un gel de printemps en avril 2016. Ainsi, les prélèvements sur l'extérieur des fûts ont été doublés (**Tableau 6**). Au total, 1 200 prélèvements ont été collectés pour le millésime 2016 (400 par cave) et 1 500 prélèvements pour le millésime 2017 (500 par cave).

En raison de ce nombre élevé, chaque « 20 ou 40 prélèvements effectués » par environnement et par temps ont été poolés dans un volume de 20 ou 40 mL d'eau physiologique (NaCl à 0,9% w/v) respectivement pour obtenir un échantillon moyen. Ainsi, 20 échantillons moyens au total ont été obtenus par millésime et par cave sur les différents environnements (sol, murs, matériel et extérieur des fûts) (**Tableau 7**).

Tableau 6 : Surfaces et nombre de prélèvements effectués sur les différents environnements des caves d'élevage en production.

Environnements		Sol	Murs	Matériel	Fûts (Extérieur)	Total prélèvements	
Surface de prélèvements	B	800 cm ²	400 cm ²	4 cm ²	1 600 cm ²		
	PR	800 cm ²	800 cm ²	4 cm ²	1 600 cm ²		
	M	800 cm ²	600 cm ²	4 cm ²	1 600 cm ²		
Nombre de prélèvements par temps	2016	Avant entonnage	20	20	20	20	80
		Fin entonnage	20	20	20	20	80
		2 mois après fin entonnage	20	20	20	20	80
		4 mois après fin entonnage	20	20	20	20	80
		8 mois après fin entonnage	20	20	20	20	80
	2017	Avant entonnage	20	20	20	40*	100
		Fin entonnage	20	20	20	40*	100
		2 mois après fin entonnage	20	20	20	40*	100
		4 mois après fin entonnage	20	20	20	40*	100
		8 mois après fin entonnage	20	20	20	40*	100

(* Nombre de prélèvements doublés car le nombre de fûts entonnés était supérieur en 2017)

Tableau 7 : Nombre d'échantillons moyens par millésime et par cave pour les différents environnements.

Environnements		Sol	Murs	Matériel	Fûts (extérieur)
Nombre d'échantillons moyens par temps	Avant entonnage	1	1	1	1
	Fin entonnage	1	1	1	1
	2 mois après fin entonnage	1	1	1	1
	4 mois après fin entonnage	1	1	1	1
	8 mois après fin entonnage	1	1	1	1
Total échantillons moyens par cave et par millésime		20			

2. Isolement, culture et conservation des microorganismes

A partir des différents échantillons moyens (moûts, vins et environnements de la nouvelle cuverie et des environnements des 3 caves d'élevage), des dénombrements des populations cultivables ont été réalisés. Après une série de dilutions décimales effectuées avec de l'eau physiologique, 3 x 100 µL de chaque dilution ont été étalés sur 2 milieux gélosés différents :

- Le milieu YPD pour le dénombrement de la population levurienne totale : 0,5% p/v d'extrait de levure, 1% p/v de bacto-peptone, 2% p/v de glucose, 2% p/v d'agar et 0,02% p/v de chloramphénicol (pour inhiber la croissance des bactéries).
- Le milieu ITV sélectif des levures d'altération *Brettanomyces* décrit par Gerbaux *et al.* (2000) : 1% p/v d'extrait de levure, 2% p/v de bacto-peptone, 2% p/v de glucose, 0,01% p/v d'acide *p*-coumarique, 0,01% d'acide férulique, 0,003% de vert de bromocrésol, 0,006% de cycloheximide, 0,02% p/v de chloramphénicol et 2% p/v d'agar). Le pH de ce milieu est ajusté à 5,1.

Pour les échantillons provenant des 3 caves en production, 2 autres milieux sélectifs ont été utilisés pour le dénombrement des populations de bactéries lactiques et acétiques :

- Le milieu LAC sélectif des bactéries lactiques (3,3% p/v d'extrait de levure, 0,008% p/v de MnSO₄·H₂O, 2% p/v d'agar, 0,06% v/v de Tween 80, 1% p/v de Delvolid® et 7,8% v/v de jus de raisin blanc). Le pH de ce milieu est ajusté à 5,1.
- Le milieu GYC sélectif des bactéries acétiques (1% p/v d'extrait de levure, 10% p/v de glucose, 2% p/v de CaCO₃ et 2% p/v d'agar). La croissance des bactéries sur ce milieu entraîne une baisse du pH par formation d'acide acétique et ainsi la formation d'un halo transparent autour des colonies de bactéries acétiques.

Les boîtes de Petri ont ensuite été incubées à 20 °C pour le milieu YPD, à 28 °C sous CO₂ pour le milieu LAC et à 28 °C pour le milieu ITV et le milieu GYC. Les durées d'incubation sont variables : 48 h pour le milieu YPD et 72 h à 6-7 jours pour les autres milieux. Après incubation, les populations microbiennes ont été estimées par comptage des colonies développées et les résultats ont été exprimés en unités formant colonies par mL (UFC/mL) pour les prélèvements réalisés au cours des fermentations et en UFC/cm² pour les prélèvements réalisés sur les différents environnements de la nouvelle cuverie et des différentes caves d'élevage.

Après dénombrement, 50 colonies (en moyenne) ont été sélectionnées uniquement pour les milieux YPD et ITV. Ensuite, ces colonies ont été purifiées sur milieu YPD, puis cultivées en

milieu liquide à 28 °C pendant 48 h. Enfin les isolats ont été conservés à -80 °C dans un cryotube composé à 50% du milieu YPD liquide et 50% d'une solution de glycérol à 40% (v/v).

3. Identification des populations fongiques

3.1 Identification des populations fongiques par séquençage haut débit

3.1.1 Extraction d'ADN

A partir des échantillons moyens provenant des environnements de la nouvelle cuverie et des différentes caves d'élevage, 10 mL de chaque échantillon ont été centrifugés à 4000 rpm pendant 4 min à 4 °C. Après élimination du surnageant, le culot a été mis en suspension dans 200 µL de tampon d'extraction DNA Yeast (Triton X-100 à 2% (v/v), SDS à 1% (w/v), NaCl 100 mM, Tris 10 mM et 1 mM EDTA à pH 8). A cette suspension, 60 µL de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25: 24: 1) et 0,3 g de billes en verre (0,5 mm de diamètre) ont été ajoutés. Les cellules ont été lysées en utilisant le disrupteur 'Precellys 24-Dual' pendant 3 x 45 s et placées 2 min dans la glace. Ensuite, 200 µL de tampon TE ont été ajoutés (Tris 10 mM et EDTA 1 mM pH 8) et le mélange a été centrifugé à 13 700 rpm pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant a été repris et l'ADN a été précipité dans 1 mL d'une solution d'éthanol à 100% (v/v) et centrifugé à 13 700 rpm pendant 10 min à 20 °C. Le culot d'ADN a été lavé avec une solution d'éthanol à 70% (v/v) puis centrifugé à 13 700 rpm pendant 5 min à 20 °C. Enfin, l'ADN a été séché à 95 °C pendant 5 min afin d'éliminer l'excès d'éthanol et finalement remis en suspension dans 40 µL d'eau Milli-Q et stocké à 4 °C. Après 24 h, les ADNs extraits ont été quantifiés en mesurant l'absorbance à 260 nm. Ensuite, la concentration d'ADN a été normalisée à 5 ng/µL en ajoutant de l'eau 'DNase Free' et les ADNs ont été stockés à -80 °C pour l'analyse métagénomique.

Pour les échantillons de moûts et de vins, une étape de filtration a été effectuée avant l'extraction d'ADN. Ainsi, 10 mL de chaque échantillon de moût/vin, ont été filtrés à travers une colonne en polyamide (2,5 g de Polyamide SC6 Macherey-Nagel + NaCl 1 M). Ensuite, le même protocole d'extraction décrit précédemment a été appliqué à la suspension filtrée.

3.1.2 Amplification de la région ITS et séquençage Illumina Mi-Seq

La région ITS 2 (Internal Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomique a été amplifiée pour l'analyse métagénomique, en utilisant une approche mono-index (Taylor *et al.*, 2016). Les amorces « Phusion » ont été construites suivant le protocole du 'Earth microbiome project'

(<http://www.earthmicrobiome.org/protocols-et-stetards/its/>). Les amorces utilisées pour l'amplification de la région ITS étaient :

- 5,8 S-Fun (5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-NNNNNNNNNNNN-AGTCAGTCAG-GG-AACTTTYRRCAYGGATCWCT-3')
- ITS4-Fun (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-TATGGTAATT-AAAGCCTCCGCTTATTGATATGCTTAART-3').

Les amorces utilisées contiennent (de gauche à droite) l'adaptateur de séquençage Illumina de 24 à 29 pb, un code barre d'identification (Golay) de 12 pb, un « *primer pad* » de 10 pb, un lieu de 2 pb et la séquence codante pour le fragment ITS de 21 à 27 pb. Pour identifier spécifiquement chaque échantillon d'ADN, l'amorce 5,8 S-Fun contenait une séquence code barre (Golay) unique à chaque échantillon. Les différentes amorces et séquences code barre (Golay) utilisées au cours de cette étude sont présentées dans le **tableau 8**.

La réaction PCR a été réalisée dans un volume final de 50 µL (comprenant 2 µL d'ADN à 5 ng/µL) et dans les conditions suivantes : 94 °C pendant 5 min, suivi par 30 cycles de 30 s à 94 °C, 1 min à 60 °C et 1 min à 72 °C et une dernière étape à 72 °C pendant 5 min. Ensuite, les produits PCR ont été poolés et purifiés en utilisant le kit de purification QIAquick (Qiagen, Germantown, MD). La concentration finale a été déterminée avec le kit Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientifics, États-Unis). Le séquençage a ensuite été réalisé avec un appareil Illumina® Mi-Seq (Illumina, San Diego, Californie, États-Unis) appartenant au département de biologie de l'Université de Bari (Italie).

Tableau 8 : Amorces 'Phusion' et séquences code barre (Golay) utilisées pour le séquençage Illumina Mi-Seq.

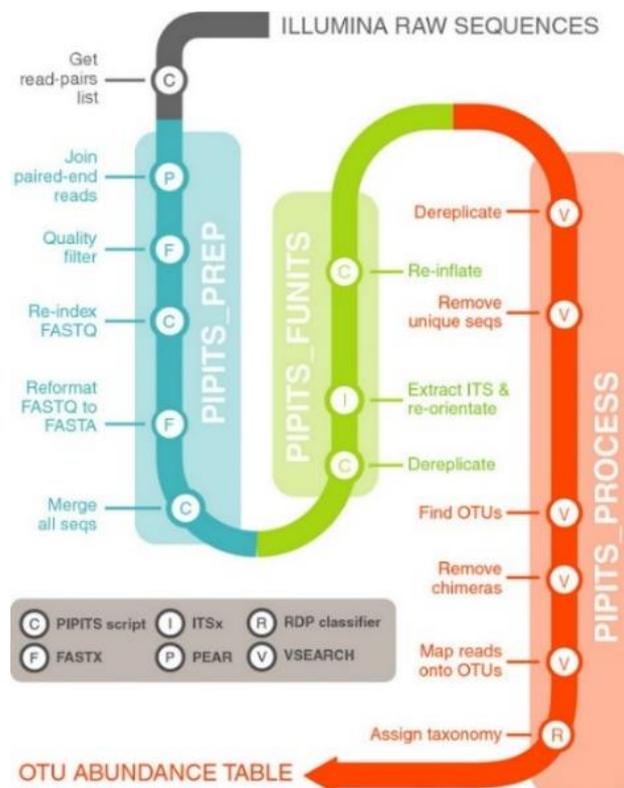
Read 1 Sequencing Primer	5'	TATGGTAATTAAGCCTCCGCTTATTGATATGCTTAART	3'						
Read 2 Sequencing Primer	5'	AGTCAGTCAGGGAACCTTYRRCAYGGATCWCT	3'						
Index Sequencing Primer	5'	AGSGATCCRTTGYRAAAGTCCCTGACTGACT	3'						
ITS4-Fun	5'	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATGGTAATTAAGCCTCCGCTTATTGATATGCTTAART	3'						
5.8S-Fun	5'	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATNNNNNNNNNNNAGTCAGTCAGGGAACCTTYRRCAYGGATCWCT	3'						
Golay barcodes:									
5'	TCCCTTGTCTCC	3'	5' ATCGCACAGTAA	3'	5' CGAGGAAAGTC	3'	5' TACTACGTGGCC	3'	5' CCACAGATCGAT
5'	TGGTAGTCTGAA	3'	5' GTCGTGTAGCCT	3'	5' CAAATTCGGGAT	3'	5' GGCCAGTTCCTA	3'	5' TATCGACACAAG
5'	GCATGTCGAAAT	3'	5' AGCGGAGGTTAG	3'	5' AGATTGACCAAC	3'	5' GATGTTGCTAG	3'	5' GATTCCGGCTCA
5'	CCTATGCACGGT	3'	5' TACAGCGCATAAC	3'	5' AGTTACGAGCTA	3'	5' CTATCTCCTGTC	3'	5' CGTAATTGCCGC
5'	CGGTGGTCATTA	3'	5' AATTGTGTCGGA	3'	5' GCATATGCACTG	3'	5' ACTCACAGGAAT	3'	5' GGTGACTAGTTC
5'	AGTCACATCCGC	3'	5' TGCATACACTGG	3'	5' CAACTCCCGTGA	3'	5' ATGATGAGCCTC	3'	5' ATGGTTCGCTC
5'	AGCGTCTGAAC	3'	5' AGTCGAACGAGG	3'	5' TTGCGTTAGCAG	3'	5' GTCGACAGAGGA	3'	5' TAGGCATGCTTG
5'	ATCGCGACTGCT	3'	5' ACCAGTGACTCA	3'	5' TACGAGCCCTAA	3'	5' TGTCGCAATAG	3'	5' AACTAGTTCAGG
5'	TGGAGGTTCTCA	3'	5' GAATACCAAGTC	3'	5' CACTACGCTAGA	3'	5' CATCCCTCTACT	3'	5' ATTCTGCCGAAG
5'	TGCTTGATGAGCA	3'	5' GTAGATCGTGTA	3'	5' TGCAGTCTCGA	3'	5' TATACCGCTGCG	3'	5' AGCATGTCCCGT
5'	CTTAAATGGGCA	3'	5' TAACGTGTGTGC	3'	5' ACCATAGTCCG	3'	5' AGTTGAGGCAT	3'	5' GTACGATATGAC
5'	GGTATCACCCG	3'	5' CATTATGGCGTG	3'	5' TCGACATCTCT	3'	5' ACAATAGACACC	3'	5' GTGGTGGTTCC
5'	CGCCTTGATAAG	3'	5' CCAATACGCCG	3'	5' GAACACTTTGGA	3'	5' CGGTCAATTGAC	3'	5' TAGTATGCGCAA
5'	CGTTTATCCGTT	3'	5' GATCTGCGATCC	3'	5' GAGCCATCTGTA	3'	5' GTGGAGTCTCAT	3'	5' TGCCTGGAATGT
5'	TTGTACTCACT	3'	5' CAGCTCATCAGC	3'	5' TTGGGTACACGT	3'	5' GCTCGAAGATTC	3'	5' ATGGCTGTCAGT
5'	GCCGCAATCGAT	3'	5' CAAACAACAGCT	3'	5' AAGGCGCTCCT	3'	5' AGGCTTACGTGT	3'	5' GTTCTCTCTCG
5'	ACGAGACTGATT	3'	5' GCAACCACTCC	3'	5' TAATACGGATCG	3'	5' TCTCTACCACTC		
5'	GCTGTACGGATT	3'	5' CGAGCAATCCTA	3'	5' TCGGAATTAGAC	3'	5' ACTTCCAACCTC		
5'	ATCCACAGGTGT	3'	5' AGTCGTGCACAT	3'	5' TGTGAATTCGGA	3'	5' CTCACCTAGGAA		
5'	TGGTCAACGATA	3'	5' GTATCTGCGCGT	3'	5' CATTCTGGCGCT	3'	5' GTGTTGTCGTGC		

3.1.3 Analyse bio-informatique des séquences obtenues

L'analyse des séquences obtenues après le séquençage Illumina Mi-Seq a été effectuée en utilisant le pipeline PIPITS (Gweon *et al.*, 2015). Les différents logiciels et paramètres utilisés par ce pipeline sont décrits dans la **figure 15**.

Figure 15 : Différents logiciels et étapes utilisés par le pipeline PIPITS pour le traitement des séquences générées par séquençage Illumina Mi-Seq.

(d'après Gweon *et al.*, 2015)



Brièvement, avant toute analyse, la qualité des séquences a été vérifiée en utilisant le logiciel FastQC. Ensuite, les séquences obtenues ont été triées en fonction des adaptateurs d'identification (index) contenus dans les amorces. Ainsi, les séquences qui ne contenaient pas la même séquence correspondante à l'index ont été éliminées. Les séquences uniques ont été ensuite alignées en utilisant le FASTX Toolkit, et regroupées en unités taxonomiques opérationnelles (OTUs). Après plusieurs étapes de filtrage et déréplication (élimination des séquences redondantes), les séquences répondant à tous les facteurs ont ensuite été utilisées pour l'assignation taxonomique par similarité avec les séquences présentes dans la base de données 'UNITE fungal database' (Kõljalg *et al.*, 2005).

3.2 Discriminations interspécifique et intraspécifique (espèces *Saccharomyces cerevisiae* et *Brettanomyces bruxellensis*)

3.2.1 PCR-ITS

Afin d'identifier les isolats, une discrimination interspécifique (*Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*) a été réalisée. Ainsi, une étape d'extraction d'ADN a été réalisée à partir de colonies fraîches selon le protocole de Werner *et al.* (2002). Brièvement, les isolats ont été remis en culture, puis une colonie a été prélevée et mélangée à 40 µL de NaOH (20 mM) et chauffée à 99 °C pendant 10 min. Après centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min, le surnageant contenant l'ADN a été conservé pour l'analyse PCR.

La région ITS (Internal Transcribed Spacer) codante pour l'ARNr 5.8S a été amplifiée en utilisant les amorces ITS1 et ITS4 permettant ainsi la discrimination entre les isolats *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* (White *et al.*, 1990). Les conditions de PCR décrites par Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) ont été utilisées. Les fragments amplifiés ont ensuite été analysés à l'aide d'un automate d'électrophorèse capillaire (MultiNA MCE202, Shimadzu).

3.2.2 Identification et discrimination des souches de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*

Les isolats présentant un fragment spécifique aux alentours de 880 pb (correspondant à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*) ont été sélectionnés dans le but de réaliser une discrimination intraspécifique par PCR Interdelta. Cette technique a été choisie en raison de son pouvoir discriminant au niveau de la souche (Legras et Karst, 2003 ; Ayoub *et al.*, 2006). Les amplifications ont été réalisées à l'aide des amorces delta 12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') et delta 21 (5'-CATCTTAACACCGTATATATGA-3') et selon les conditions définies par Legras et Karst (2003). La taille des fragments interdelta a été déterminée par électrophorèse capillaire en utilisant l'automate MultiNA MCE202, Shimadzu.

La discrimination des souches de *S. cerevisiae* a été réalisée en utilisant une matrice binaire qui attribue, respectivement, une valeur de 0 ou 1 (l'absence ou la présence d'un fragment interdelta, respectivement). Les similarités entre les profils interdelta ont été évaluées par Classification Hiérarchique Ascendante (CAH) en utilisant la méthode de Ward's avec un indice de Dice. Deux profils sont considérés comme identiques (même souche) s'ils possèdent une dissimilarité inférieure ou égale à 8%.

3.2.3 Identification et discrimination des souches de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis*

Les isolats présentant un fragment spécifique aux alentours de 485 pb (caractéristique du genre *Brettanomyces*) ont été sélectionnés et la confirmation de l'appartenance de ces isolats à l'espèce *B. bruxellensis* a été réalisée par PCR nichée à l'aide de deux couples d'amorces (Ibeas *et al.*, 1996) :

- DB1 (5'-AGAAGTTGAACGGCCGCATTTGCAC-3')/DB2 (5'-AGGATTGTTGACACTCTCGCGGAGG-3')
- et DB3 (5'-CGGCATATCGAAGACAG-3')/DB4 (5'-CATCCTCGCCATACAAC-3').

La réaction PCR a été conduite selon les conditions précisées par Ibeas *et al.* (1996).

Après validation de l'appartenance à l'espèce *B. bruxellensis*, la discrimination au niveau de la souche a été réalisée en collaboration avec le laboratoire Microflora (Bordeaux, France). En utilisant la technique de PCR microsatellites, 12 marqueurs microsatellites ont été amplifiés puis analysés par séquençage (Albertin *et al.*, 2014a). Les conditions de la réaction PCR et l'analyse des amplicons ont été réalisés selon Avramova *et al.* (2018a). Pour chaque isolat et pour chaque marqueur microsatellite, un nombre de motifs répétés a été attribué. La discrimination entre les souches a été réalisée en fonction de la variabilité du nombre de répétitions et de la taille en pair de bases de chaque microsatellite analysé. Ainsi, deux isolats sont considérés comme appartenant à la même souche s'ils présentent le même nombre de répétitions et la même taille pour les 12 marqueurs microsatellites.

Chapitre 3 : Biodiversité et évolution du consortium fongique d'une nouvelle cuverie

Au fil des années, beaucoup de travaux ont été menés sur l'étude de la biodiversité microbienne au cours du processus de vinification. Utilisant les méthodes conventionnelles d'identification des microorganismes, plusieurs genres de levures, bactéries, moisissures et champignons ont été identifiés le long de ce processus (Amerine et Kunkee 1968 ; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999 ; Baleiras-Couto *et al.*, 2005 ; Cocolin et Ercolini 2008 ; Ivey et Phister 2011). Cependant, l'utilisation de ces méthodes permet l'accès à une petite fraction de l'ensemble des microorganismes pouvant être présents dans un échantillon. Ainsi, le développement de nouvelles technologies tel que le séquençage de nouvelle génération (NGS) a permis de mieux comprendre la complexité des communautés microbiennes dans le processus de vinification (Belda *et al.*, 2017 ; Morgan *et al.*, 2017). En effet, les techniques NGS ont mis en évidence une diversité microbienne plus importante dans les moûts et les vins (David *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2015) et des espèces fongiques (*Cytospora*, *Gigaspora*, *Naganishia*, *Rhodosporidiobolus*, *Vuilleminia*) ont été nouvellement décrites (Bokulich *et al.* 2013 ; Kecskeméti *et al.* 2016 ; Mezzasalma *et al.*, 2017). De plus, ces techniques ont également permis d'étudier la biodiversité microbienne dans des environnements plus complexe comme les environnements reliés au vin (sol, murs et matériel vinaire) nommés WREs (Wine Related Environments). Ainsi, les travaux utilisant les techniques NGS ont mise en évidence une grande diversité microbienne sur les différents WREs de cuverie en production (Bokulich *et al.* 2013). De plus, par le biais des méthodes moléculaires intraspécifiques, plusieurs auteurs ont confirmé la persistance des souches de levures non-*Saccharomyces* (*Hanseniaspora guilliermondii* et *H. uvarum*) (Grangeteau *et al.* 2016) et de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (Santamaría *et al.*, 2005 ; Mercado *et al.*, 2007) dans l'environnement de cuverie en production et leur implication au cours des fermentations. Ainsi, ces observations soulignent le rôle important des environnements reliés au vin, particulièrement l'environnement de la cuverie, comme véritable niche écologique. Cependant, l'établissement d'un consortium fongique dans l'environnement d'une cuverie n'est, à ce jour, pas connu étant donné que les travaux précédents ont été menés dans des cuveries en production. Afin de mieux comprendre l'établissement du consortium fongique dans les WREs et son évolution au cours du temps, il est donc nécessaire d'étudier la biodiversité et l'évolution des populations fongiques dans une cuverie neuve. De plus, depuis le début du 21^{ème} siècle, le nombre de nouvelles constructions vinicoles (nouvelles cuveries) augmente sans cesse au niveau international et particulièrement en Europe (Bruyas, 2003 ; Eurostat, 2015).

A notre connaissance, 3 études ont été réalisées dans de nouvelles cuveries (Constantí *et al.*, 1997 ; Beltran *et al.*, 2002 ; Clavijo *et al.*, 2011). Néanmoins, ces études se sont focalisées sur l'effet de l'utilisation de levures commerciales sur la biodiversité levurienne dans le moût/vin dès le premier millésime. Malgré la mise en évidence de la capacité des souches commerciales à s'implanter dans les fermentations des futurs millésimes, leur présence n'a jamais été décrite. De même, la biodiversité microbienne présente sur les WREs n'a pas été décrite dans ces études.

Ainsi, dans ce chapitre de la thèse nous présentons les résultats obtenus concernant l'étude par séquençage Illumina Mi-Seq, de la biodiversité des populations fongiques dans l'environnement (sol, murs et matériel vinaire) d'une nouvelle cuverie avant l'arrivée de la première vendange et ensuite au cours de deux millésimes consécutifs.

**OPEN** **The establishment of a fungal consortium in a new winery**Hany Abdo¹, Claudia Rita Catacchio¹, Mario Ventura¹, Pietro D'Addabbo², Hervé Alexandre¹, Michèle Guilloux-Bénatier¹ & Sandrine Rousseaux¹✉

The biodiversity and evolution of fungal communities were monitored over a period of 3 vintages in a new winery. Samples were collected before grape receipt and 3 months after fermentation from 3 different wine related environments (WRE): floor, walls and equipment and analyzed using Illumina Mi-Seq. Genera of mold and filamentous fungi (294), non-enological (10) and wine-associated yeasts (25) were detected on all WREs before the arrival of the first harvest. Among them, genera like *Alternaria* and *Aureobasidium* persisted during two vintages. Therefore, these genera are not specific to winery environment and appear to be adapted to natural or anthropic environments due to their ubiquitous character. Some genera like *Candida* were also detected before the first harvest but only on one WREs, whereas, on the other WREs they were found after the harvest. The ubiquitous character and phenotypic traits of these fungal genera can explain their dynamics. After the first harvest and during 3 vintages the initial consortium was enriched by oenological genera like *Starmerella* introduced either by harvest or by potential transfers between the different WREs. However, these establishing genera, including *Saccharomyces*, do not appear to persist due to their low adaptation to the stressful conditions of winery environment.

Over the years, extensive research has been conducted on microbial biodiversity during the winemaking process. Microorganisms including filamentous fungi, bacteria and yeasts have been identified throughout the whole process using conventional culture-dependent techniques or molecular methods resulting in the description of this process as a true microbial ecosystem^{1,2}. To understand the different roles of these microorganisms, especially yeasts, in wine fermentation and their impact on wine quality, in-depth knowledge of their population dynamics is needed. The development of recent technologies such as Next-Generation Sequencing (NGS) provided more complete understanding of the complexities of microbial communities^{3,4}. These methods have uncovered that the microbial diversity is higher than expected^{5,6} and new microbial species (*Cytospora*, *Gigaspora*, *Naganishia*, *Rhodospiridiobolus*, *Vuilleminia*) have also been described⁷⁻⁹. Moreover, these methods made it possible to study diversity in more varied ecosystems like Wine-Related Environments (WREs: floor, walls and equipment)¹⁰. All these works described the presence of the same genera or species in different WREs and during the winemaking process, suggesting the persistence of these microorganisms during several vintages and their transfer between different WREs or between WREs and must or wine.

Intraspecific fingerprinting techniques were used to confirm the persistence and the transfer of microorganisms like *Saccharomyces cerevisiae*. Thus, techniques like mtDNA-RFLPs and interdelta PCR, were used to demonstrate the implantation and/or persistence of commercial strains of *S. cerevisiae* in must/wine and in WREs¹¹⁻¹⁴. Indeed, a previous study showed that, although no longer used, commercial strains of *S. cerevisiae* can survive in the winery ecosystem for one year¹². Concerning autochthonous *S. cerevisiae*, despite its low presence in the vineyard¹⁵, studies have shown that certain strains implicated in spontaneous fermentations originated from the winery environment^{13,16,17}, or in some cases from the vineyard¹⁷. Moreover, implantation and persistence on the WREs and during the alcoholic fermentation (AF) were also highlighted for several non-*Saccharomyces* species^{18,19}. Using FT-IR spectroscopy, the persistence of the species *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during two vintages in the winery environment and their implantation in grape must have been previously demonstrated¹⁹.

All these findings highlighted: (i) the important role of WREs as an ecological niche for winery flora, and (ii) the implication of winery resident flora in the winemaking process.

¹Université Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France- IUUV Equipe VAIMiS, rue Claude Ladrey, BP 27877, 21078, Dijon, Cedex, France. ²Department of Biology, University of Bari, Bari, 70125, Italy. ✉e-mail: sandrine.rousseau@u-bourgogne.fr

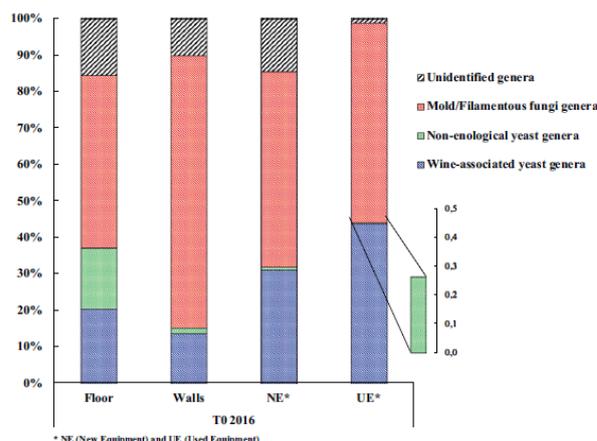


Figure 1. Percentages of the different fungal genera found on the different WREs of the new winery before the arrival of the first harvest (T0 2016).

	Floor	Walls	NE*	UE*	All WREs
Wine-associated yeast genera	19	12	9	14	25
Non-enological yeast genera	5	7	5	5	10
Total different yeast genera	24	19	14	19	35
Mold & Filamentous Fungi genera	59	146	66	34	294
Total different identified genera	83	165	80	53	329

Table 1. Number of identified fungal genera on the different WREs of the new winery before the arrival of the first harvest (T0 2016). *NE (New Equipment) and UE (Used Equipment).

From the beginning of the 21st century, the number of new wine holdings has been increasing worldwide^{20,21}. To our knowledge, only 3 studies were focused on yeast biodiversity in newly established wineries during several vintages^{22–24}. But, none of them assessed the total fungal population (yeasts, mold and filamentous fungi) present in WREs and especially before the arrival of the first harvest. Moreover, the authors focused only on the diversity of the yeast population using a culture-dependent technique (mtDNA-RFLP) and on the effect of using commercial strains on the diversity of yeast populations found during the AF. Indeed, the results showed the capacity of starter strains to persist and become resident in the environment of new wineries^{22,24}; however, no real evidence of their presence was proven in WREs.

Considering the growing interest in vinification with indigenous flora, the study of the evolution of microbial populations on the WREs of a new winery without using commercial strains is of high interest.

In this direction, in the present study we collected several samples from three different winery surfaces (floor, walls and equipment), for three consecutive vintages (2016, 2017 and 2018) and at separate time points (before grape harvest and 3 months after fermentation) and used NGS technologies to study the fungal biodiversity populations in the WREs of a new winery. We were able to study the microbial dynamics over time focusing on the contribution of fungal populations present on grapes and in must to WREs populations. We gained new insights on the capacities and mechanisms developed in the establishment or colonization of a fungal consortium in the winery environment.

Results and Discussion

Fungal status of the new winery before the arrival of the first harvest. The fungal diversity on the WREs of a new winery operating exclusively in spontaneous fermentation was studied to determine the fungal status of the winery before the arrival of the first harvest (T0 2016). Samples were collected from the floor, walls, new (NE) and used (UE) equipment. After Illumina sequencing, fungal OTUs were classified into 3 categories: (i) the mold and filamentous fungi genera, (ii) the yeast genera never described before in the winemaking process (named non-enological yeasts), and (iii) the yeast and yeast-like genera already described in the winemaking process (named wine-associated yeasts) (Fig. 1). Wine-associated yeasts include all the genera described in the literature in the vineyard, vine, grapes, must, wine and winery surfaces^{25–29}.

Mold and filamentous fungi dominated the fungal genera identified on all the surfaces before the first harvest, with 294 different genera (Fig. 1 and Table 1). Yeast genera (non-enological and wine-associated) were identified before the arrival of any harvest in any of the WREs (Fig. 1 and Table 1) and a total of 35 different genera were found (Table 1). Wine-associated yeasts were identified on all the studied surfaces of the new winery and dominated the yeast population detected (Fig. 1 and Table 1). The identification of non-enological yeast genera may

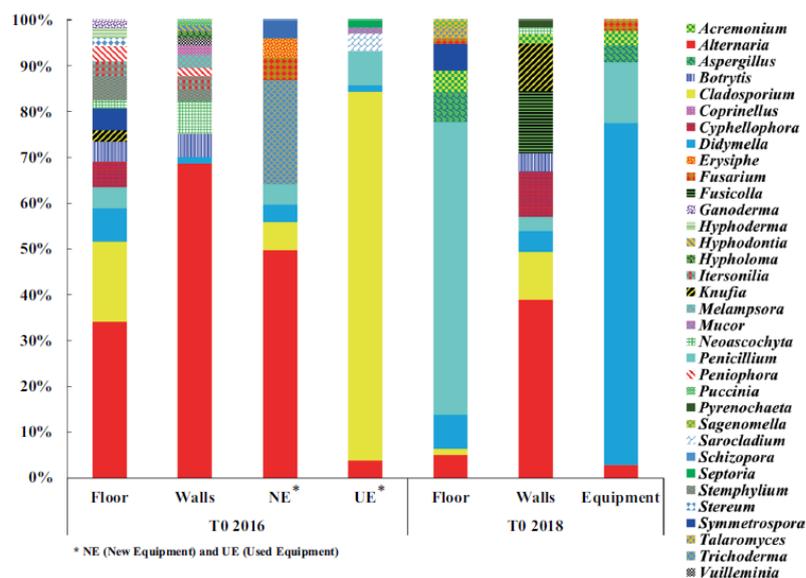


Figure 2. Relative abundance of the most represented mold and filamentous fungi genera identified on the different WREs prior to the 2016 and 2018 harvests. Represented genera are >1% relative abundance.

have resulted from the use of high-performance Illumina sequencing and the constant enrichment of the databases used^{7,30}. The new winery surfaces (floor, walls and new equipment) showed a higher percentage (average 13%) of unidentified genera compared to the used equipment (1%) (Fig. 1).

Diversity and dynamics of mold and filamentous fungi genera. The different genera of mold and filamentous fungi identified at T0 2016 are represented using their relative abundances. Only the genera that represented >1% of relative abundance were selected (Fig. 2). Thus, a total of 32 mold and filamentous fungi genera among the 294 were identified on all the winery surfaces. At T0 2016, the taxonomic profiles observed on the floor, walls and the new equipment were quite close (with high representativeness of the genus *Alternaria*) compared to the used equipment which was dominated by the genus *Cladosporium* with the highest relative abundance (79%). These two genera had opposing relative abundances (a high abundance of *Alternaria* occurs with a low abundance of *Cladosporium* and vice-versa), suggesting potential interaction.

After two years of operations, a considerable modification of taxonomic profiles was observed, especially for the winery floor and equipment. These modifications resulted in a significant decrease in the total number of different identified genera (32 genera at T0 2016 and only 16 genera at T0 2018), as well as evolutions in the dominant genera (Fig. 2). So, the dominant genera *Alternaria* and *Cladosporium* described at T0 2016 were detected to a lesser extent at T0 2018, but persisted after 2 vintages. Their persistence throughout the whole study can be due to the presence of spores that might have been deposited from the surrounding atmosphere of the winery. Indeed, spores of *Alternaria* and *Cladosporium* are known to be widespread airborne spores³¹. Opposite abundances between the genera *Alternaria* and *Cladosporium*, observed at T0 2016, were also observed at T0 2018, suggesting again potential interaction (Fig. 2). After two years of operations, some genera became more widespread, like the genera *Penicillium* on the floor (57%) and *Didymella* on the equipment (68%). On the walls, *Alternaria* remained the most detected genus (35%), but new genera such as *Cladosporium*, *Cyphellophora*, *Fusicolla*, *Knufia* and *Penicillium* were also detected. The genus *Acremonium* was newly detected on all the WREs and the genus *Aspergillus* on the floor and equipment (Fig. 2).

Based on these results, implantation, colonization and persistence of some genera of mold and filamentous fungi were observed. For example: the genera *Alternaria* and *Didymella* present on all WREs between the vintages 2016 and 2018 can be considered as resident genera capable of persistence. After 2 years, genera *Cladosporium* and *Penicillium* are able to establish in all environments and persist. All these genera can therefore be qualified as ubiquitous genera. As for the genera *Acremonium* and *Aspergillus*, their implantation on environments might be linked to human activity and/or ventilation, which is an important factor of transfer of microorganisms between winery surfaces³². In addition, humidity and temperature described as two parameters influencing the growth of mold and filamentous fungi on surfaces like building material^{33–35} may also be factors influencing the establishment and persistence of the genera present on WREs.

Diversity and dynamics of non-enological yeast genera. Ten different genera of non-enological yeasts were detected before the arrival of the first harvest on all WREs. The genera *Exophiala* and *Hannaella* were the only genera present on all the winery surfaces with the highest percentage on winery floor (25% and 10%, respectively) (Table 2). After the 2 genera mentioned above, the genus *Leucosporidium* is the one with the highest percentages on winery floor (9%) and on walls (5%). These three genera are usually found in natural ecosystems

Yeast genera	Floor						Walls						Equipment					
	2016		2017		2018		2016		2017		2018		2016		2017		2018	
	T0	T3	T0	T3	T0	T0	T3	T0	T3	T0	T0	T3	T0	T0 UE*	T3	T0	T3	T0
<i>Buckleyzyma</i>		2.24	2.97	2.49	1.84	0.77	0.18	0.44	0.08	0.59	1.13	0.22	0.03					0.21
<i>Cutaneotrichosporon</i>		0.36	0.10	1.06	0.23	0.70	0.09										0.26	0.04
<i>Cystofilobasidium</i>				0.03					0.01				0.03					
<i>Exophiala</i>	25.36	8.45	46.45	31.43	13.09	2.16	2.30	15.34	6.67	21.98	0.19	0.05	0.06	0.12	3.26	5.05		
<i>Hannaella</i>	10.43	6.35	26.44	1.79	20.19	1.24	0.60	7.13	7.62	37.36	0.19	0.05	0.09		0.05	2.49		
<i>Kondoa</i>												0.11						
<i>Kregervanrija</i>				0.05	0.03		0.18				0.02					0.53		
<i>Kwoniella</i>				0.06									0.03					
<i>Leucosporidium</i>	8.83	9.68	10.35	5.29	1.85	4.87	0.78	16.47	13.44	14.58					1.53	1.74	0.42	
<i>Lodderomyces</i>				0.07														
<i>Malassezia</i>			0.01															
<i>Oberwinklerozyma</i>								0.10										
<i>Occultifur</i>									0.06									
<i>Ogataea</i>				0.11	0.14		0.09		0.04									
<i>Papiliotrema</i>			0.02		0.26				0.01				0.75					
<i>Piskurozyma</i>	0.32		0.04						0.04						0.12			
<i>Pseudomicrostroma</i>															0.03			
<i>Saitozyma</i>								0.13				1.31						
<i>Schwanniomyces</i>									0.02									
<i>Trichosporon</i>				0.05	0.07		0.23									0.42		
<i>Udeniomyces</i>		1.01				0.31						0.38	0.05	0.02	1.76			
<i>Yamadazyma</i>	3.69	0.72	0.02	0.15	0.33	0.08	1.70	0.10		0.02						2.10	0.42	
Total	48.64	28.81	86.42	42.57	38.04	10.12	6.16	39.71	27.98	74.55	3.19	0.49	1.07	3.53	8.36	8.63		

Table 2. Percentage of non-enological yeast genera identified on the different WREs throughout 2016, 2017 and 2018 vintages. Calculation was realized on the overall yeast populations. Bold type genera correspond to those identified at T0 2016. *(NE) New Equipment and (UE) Used Equipment.

like plants, soil, water and decaying wood material^{36–39}. Therefore, it was not surprising to find these 3 genera on the surfaces of this new winery. These genera can therefore be qualified as ubiquitous genera.

Between T0 2016 and T0 2018, a significant increase in the biodiversity and quantity of non-enological yeasts were observed. Biodiversity-wise, 21 genera were detected at T0 2018 while only 8 genera were found at T0 2016. Quantity-wise, a 7-fold increase in the percentage of non-enological yeast was observed between these two time points on the walls (Table 2). Transfers of yeasts between different surfaces can be carried out by air flow and bioaerosol activity⁴⁰ and over a period of one year²⁷. Thus, these different transfers may explain the increase and dynamics of non-enological yeasts between T0 2016 and T0 2018. The two most abundant genera *Exophiala* and *Hannaella*, found initially at T0 2016, persisted in the winery environment throughout all the vintages and on all the winery surfaces. These two genera presented very high percentages, especially at T0 2017 on winery floor (73%) and T0 2018 on the winery walls (59%), however they did not exceed 5% on the winery equipment (Table 2). So, these results suggest that the conditions of every WRE plays an important role in retaining and shaping the fungal consortium of the winery. Indeed, the proliferation of fungi detected on different building material or in a particular area depends on the growth material and the conditions (e.g. humidity and temperature) under which they are found^{40,41}. Compared to *Exophiala* and *Hannaella*, the genus *Leucosporidium* also persisted and colonized all WREs but with low percentages. Other genera previously detected at T0 2016, like, *Buckleyzyma*, *Cutaneotrichosporon* and *Yamadazyma* were detected frequently on all WREs but at very low levels (highest percentage: 2%) over the three vintages. Eleven new genera (e.g. *Cystofilobasidium*, *Kondoa*, *Kregervanrija*, *Kwoniella*, *Lodderomyces*, *Malassezia*, *Oberwinklerozyma*, *Occultifur*, *Ogataea*, *Papiliotrema*, *Piskurozyma*, *Pseudomicrostroma*, *Saitozyma*, *Schwanniomyces*, *Trichosporon* and *Udeniomyces*) were detected punctually (1 or 2 times between T0 2016 and T0 2018) and the majority of them were detected after the fermentation activity (Table 2).

As for mold and filamentous fungi, different behaviors of non-enological yeasts were observed: some genera that can be considered as resident (environmental flora) and capable of persisting (*Exophiala* and *Hannaella*), genera capable of establishing and persisting (*Buckleyzyma*, *Cutaneotrichosporon*, *Leucosporidium* and *Yamadazyma*) and finally genera brought by the fermentation activity (e.g. *Kregervanrija* and *Ogataea*).

Diversity and dynamics of wine-associated yeast genera. At T0 2016, the taxonomic profiles for the floor, walls and the new equipment are quite close compared to the used equipment (Fig. 3), as described previously for mold and filamentous fungi. Relative abundance profiles show that the winery floor, walls and new

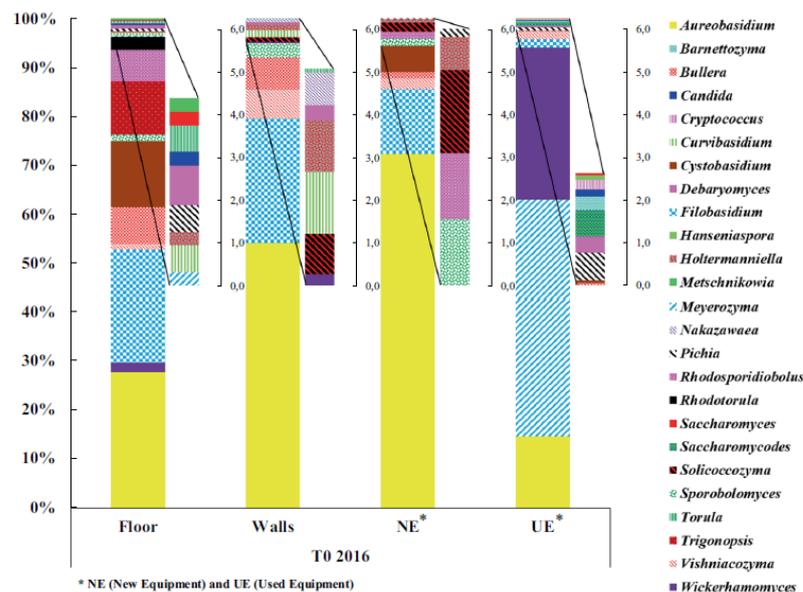


Figure 3. Relative abundance of wine-associated yeast genera identified on the different WREs of the new winery at T0 2016.

equipment are primarily dominated by the yeast-like genus *Aureobasidium* (30%, 55% and 70%, respectively) and the genus *Filobasidium* (22%, 29% and 15%, respectively); however the used equipment is dominated by the genera *Meyerozyma* (45%), *Wickerhamomyces* (30%) and *Aureobasidium* (14%) (Fig. 3). Genus *Aureobasidium* was a dominant and common genus to all WREs, probably due to its capacity to persist in stress conditions linked to the sporulation ability of this genus⁴².

Before the arrival of the first harvest, yeast genera of enological interest like *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia* and *Saccharomyces* were detected. Their presence on the used equipment is not surprising and is linked to the presence of must residues and/or wine, particularly in areas that are difficult to clean. The detection of the genera *Candida*, *Pichia* and *Saccharomyces* on the winery floor could be explained by the potential transfer between this environment and the used equipment due to human activities. Before the arrival of the first harvest, none of the yeast genera of enological interest were identified on the walls (Fig. 3).

Dynamics of wine-associated yeasts through three vintages on floor. On the winery floor at T0 2016, the 5 genera *Aureobasidium*, *Candida*, *Cystobasidium*, *Filobasidium* and *Wickerhamomyces* represented more than 65% of the total abundance (Fig. 4a). These genera were detected over time with the highest abundance: at T3 2016 (95%), at T0 2017 (92%), at T3 2017 (79%) and at T0 2018 (70%), but also with changes in their percentage of abundance. Indeed, a 75-fold increase of the genus *Candida* was observed at T3 2016, probably due to the fermentation activity (transfer from must and wine). The genera *Bullera*, *Vishniacozyma* and *Metschnikowia* detected at T0 2016 were also detected over time. The genus *Saccharomyces* detected at T0 2016 (<1%) was detected only at T3 2016 till T3 2017 but not at T0 2018. The genera *Hanseniaspora*, *Priceomyces* and *Starmerella* described on grapes and must^{19,42} were newly detected probably brought in during the harvest with the grapes and harvest equipment.

During the 3 vintages, the presence of spoilage microorganisms like the genera *Dekkera* (as from T3 2017) and *Zygosaccharomyces* (as from T3 2016) was observed on the winery floor (Fig. 4a). The presence of these yeasts 3 months after the AF could be strongly linked to the fermentation activity (transfer from must and wine). However, their implantation and persistence took place on the winery floor only after the second harvest.

Therefore, we showed that the communities found at T0 2016 conditioned the future resident flora (T0 2018) on the winery floor by the presence over time of the same 16 genera, particularly the genera *Aureobasidium*, *Candida*, *Cystobasidium*, *Filobasidium*, *Metschnikowia* and *Wickerhamomyces*, while others (*Solicoccozyma* and *Torula*) showed punctual presence. We also showed that the AF might underlie the enrichment (*Candida*) or introduction of genera of interest (*Hanseniaspora* and *Starmerella*) and/or spoilage (*Dekkera* and *Zygosaccharomyces*) yeasts on the winery floor.

Dynamics of wine-associated yeasts through three vintages on walls. Some dominant genera on the walls were in common with those found on the floor, like *Aureobasidium*, *Bullera*, *Filobasidium*, *Vishniacozyma* and *Wickerhamomyces*. Their evolutions were similar as they were detected over the three vintages but changes in their percentage of abundance are observed. New genera like *Candida*, *Cryptococcus*, *Cystobasidium*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Saccharomyces* and *Starmerella* were detected after the first or the second harvest (Fig. 4b). Their presence on the walls may have been due to transfer *via* grape berries and/or must because they are also commonly described on grape berries and must^{26,43} or to the result of transfers between WREs by air flow or bioaerosol

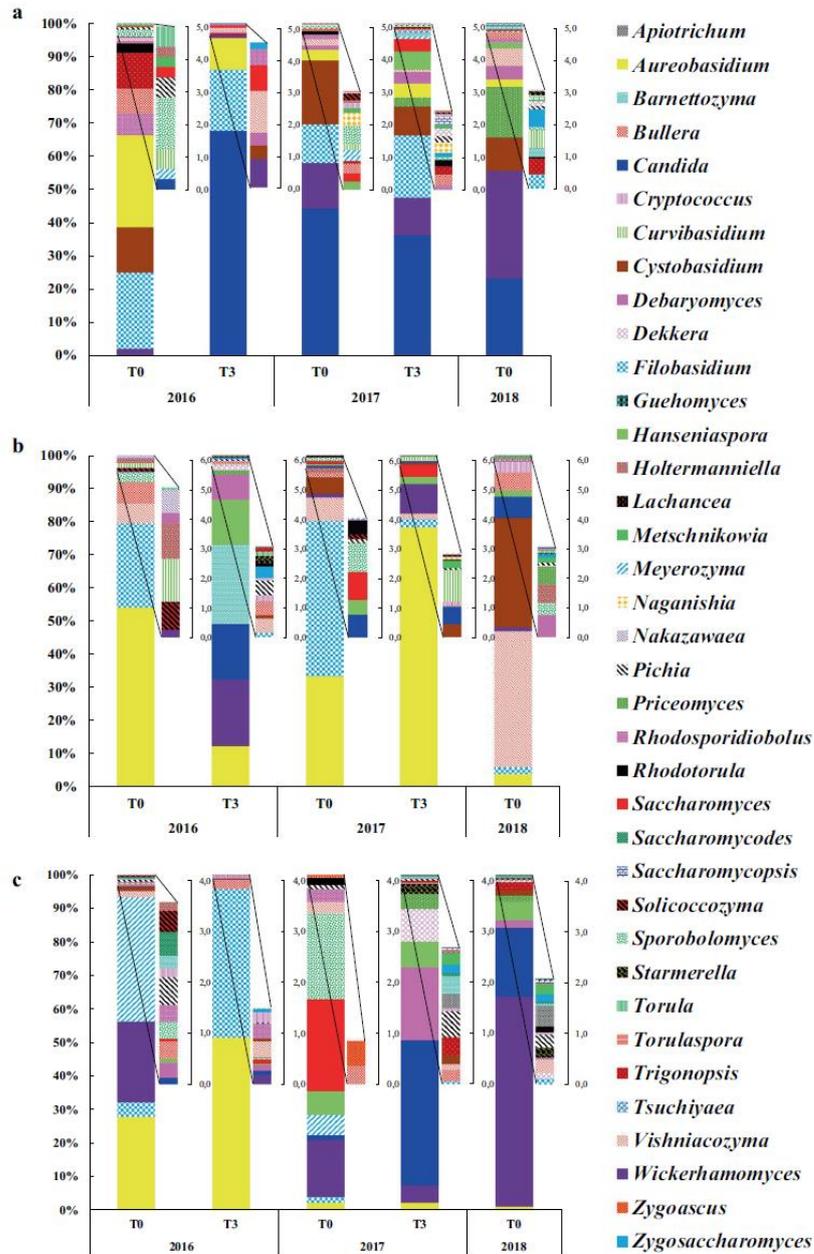


Figure 4. Relative abundance of wine-associated yeast genera identified on winery floor (a), walls (b) and equipment (c) throughout 2016, 2017 and 2018 vintages. Taxonomic profile at T0 2016 is the average of profiles obtained on old and new equipment.

activity. In addition, the increase in the abundance of some genera already present on the walls at T0 2016, such as *Debaryomyces*, may also have been due to fermentation activity and/or to the transfer of these genera between WREs. The spoilage genera *Dekkera* and *Zygosaccharomyces* were detected only at T3 2016 and at T0 2018 (Fig. 4b), and did not show real persistence.

Thus, after 2 years, the resident flora of winery walls included 6 wine-associated yeast genera (*Aureobasidium*, *Bullera*, *Debaryomyces*, *Filobasidium*, *Vishniacozyma* and *Wickerhamomyces*) found between T0 2016 and T0 2018, as previously described for winery floor. The AF activity also impacted the yeast flora of the walls (particularly the first fermentation) by the enrichment of certain genera like *Debaryomyces* and *Wickerhamomyces* and by the occurrence of new genera like *Candida*, *Cryptococcus*, *Dekkera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Starmerella* and *Zygosaccharomyces*. The genus *Saccharomyces* was only detected during the 2017 vintage (T0 and T3), and did not persist in 2018. However, certain genera persisted until 2018 (e.g. *Candida*, *Hanseniaspora*). In

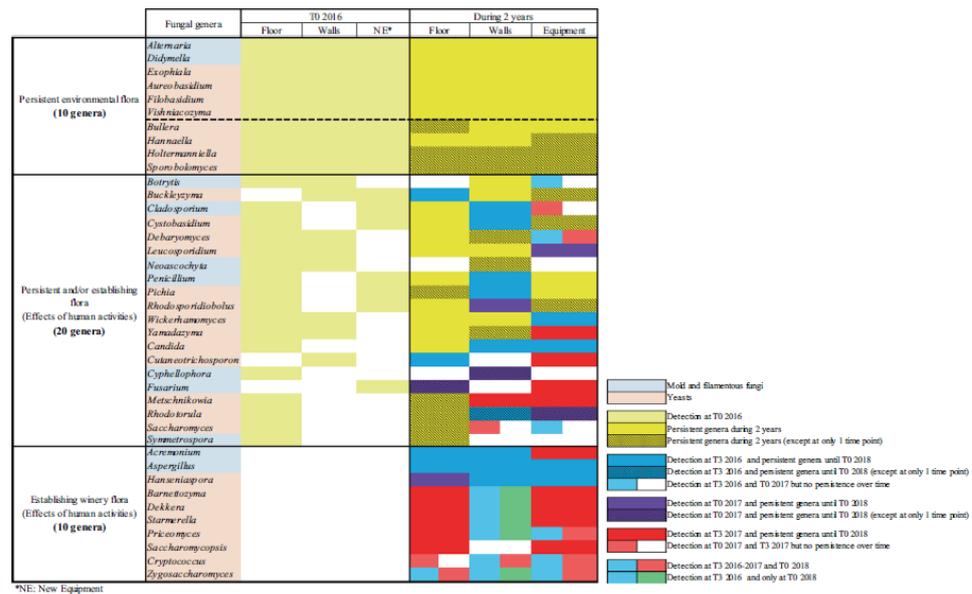


Figure 5. Resident and established fungal genera detected on the different WREs. Mold and filamentous fungi genera represented are >1% of relative abundance.

addition, the flora of the walls showed radical changes at different time points. Thus, the resident flora of the walls appeared to have a higher state of instability than that of the winery floor. This instability may also be due to the fact that several genera, mainly of enological interest, were not in an environment favorable for their installation. Their presence appeared to be the result of transfers from other surfaces.

Dynamics of wine-associated yeasts through three vintages on equipment. At T0 2016 an average taxonomic profile was established by the association of the 2 profiles obtained from the used and new winery equipment (Fig. 4c). The genera *Aureobasidium* and *Filobasidium*, which were more abundant for the 2016 vintage (as for floor and walls), presented very low abundances afterwards (10% at T0 2017, 2% at T3 2017 and 1% at T0 2018). Throughout the vintages, the taxonomic profiles became enriched by other genera, most importantly, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces* and *Wickerhamomyces* which became more widespread (Fig. 4c). The presence of these genera, and more particularly for the genus *Saccharomyces*, probably resulted from must handling (beginning of AF in a fermentation tank) before the sampling of the winery equipment at T0 2017. After this time point, the genus *Saccharomyces* was not detected, so does not seem to persist. The higher presence of non-*Saccharomyces* yeasts compared to *Saccharomyces* on winery equipment have been previously reported⁴⁴.

The spoilage genera *Dekkera* and *Zygosaccharomyces* were both probably provided by must and/or wine, particularly for the 2017 vintage. The highest abundance of the genus *Dekkera* was observed at T3 2017 and persisted to T0 2018 (Fig. 4c).

Thus, the changes of wine-associated yeasts on winery equipment showed specific dynamics compared to the floor and walls. Shifts in the taxonomic profiles were observed between the 2016 vintage and the next vintages. These observations and interpretations must take into account that winery equipment is regularly cleaned and is in direct contact with must and wine. Also, the results show that the evolution of wine-associated yeasts on equipment is not conditioned by the initial yeast population (T0 2016) as found for the winery floor and walls. Despite this, some wine-associated yeast genera appear to be ubiquitous and adapted to winery conditions. Indeed, the genera *Aureobasidium*, *Bullera*, *Filobasidium* and *Vishniacozyma* were detected throughout the whole study no matter which WRE it is.

Establishment of a winery consortium. The presence of mold, filamentous fungi and yeasts on the WREs of a new winery before the arrival of the first harvest was described. Considering the different abundances of all the genera (not only those which represent >1%), a total of 329 different fungal genera were identified at T0 2016 (294 mold and filamentous fungi and 35 yeasts) on all the WREs, which have never been described before. After 2 years, 172 fungal genera (132 mold and filamentous fungi and 40 yeasts) were identified and 17 fungal genera were newly detected (5 mold and filamentous fungi and 12 yeasts).

Among the total fungal genera and in terms of abundance, a total of 40 genera (mold, filamentous fungi and yeasts) presented different evolutions over time (Fig. 5). On the one hand, 10/40 genera (*Alternaria*, *Aureobasidium*, *Bullera*, *Didymella*, *Exophiala*, *Filobasidium*, *Hannaella*, *Holtermanniella*, *Sporobolomyces* and *Vishniacozyma*) were detected before the first harvest (T0 2016) and throughout the whole study on all the WREs until T0 2018 (Fig. 5). The majority of these 10 genera are commonly described on the berries and/or in must

and have been considered, so far, as related to vineyard and wine-growing environments. However, according to the literature, these genera are described as ubiquitous genera widely distributed in natural ecosystems (soil, air, water and plants) and can colonize buildings^{45–47}. In fact, the genus *Alternaria* is able to survive in cold, hot and dry weather and all year round in debris and seeds^{48–50}. In addition, the sporulation capacity described for mold and fungi genera could contribute toward enhancing their persistence in adverse conditions like the winery environment^{34,51}. Certain phenotypic traits described for the persistent genus *Aureobasidium* like the production of extracellular polysaccharides⁵² and film forming capacity⁵³ may explain its persistence throughout the study. The persistence of *Bullera*, *Filobasidium* and *Vishniacozyma* genera may be related to their belonging to the Basidiomycetous yeast division and more particularly to the oxidative group of Basidiomycetous. Indeed, this group is described as being usually found in higher dominance in stressful environments and persisting well in adverse environments^{54,55}. Several studies demonstrated the tolerance of the genus *Exophiala* to different stresses⁵⁶ and the *Hannaella* yeast genus has been described in the phyllosphere of various plant species including *Vitis vinifera* and in soil^{35,57} which may explain their persistence over time. Thus, according to the results obtained in this study and the specific capacities of the genera described previously, we confirm that these 10 genera are not specific to a given environment like that of wineries. These genera are resident environmental flora that can persist in stressful environments including a winery (Fig. 5).

In addition, 20/40 of the fungal genera were detected at T0 2016 and showed persistence after 2 years on 1 or 2 WREs (Fig. 5). As previously described, ubiquitous character of these fungal genera linked to some phenotypic traits can explain their persistence^{37,39,54,55,58–70}. These genera are considered as persistent and/or establishing winery flora. Among them, some genera became established *via* the harvest or transfers between WREs, especially on the walls and equipment (Fig. 5). After their implantation, these genera were able to persist until 2018, except the genus *Saccharomyces*, which persisted only on the floor 2 years after the arrival of the first harvest (Fig. 5). After the implantation linked to harvest, the persistence of the genus *Candida* may have been due to phenotypic traits like invasive growth⁷¹ and film formation⁵³. Regarding the genus *Pichia*, the capacity of some species, isolated from grapes, to form ascospores^{72,73} and to produce killer toxins (proteins secreted by a fungi inhibiting the growth of other fungi)⁷⁴ potentially contribute to the implantation and persistence of this genus in winery environment. Establishment and persistence of the genus *Metschnikowia* may be linked to its ability to outgrow other microorganisms due to the production of reddish pulcherrimin involved in iron chelation^{75,76}. Furthermore, among the genus *Wickerhamomyces*, the species *W. anomalus* (previously known as *Pichia anomala*)⁷⁷ is known for its resistance to osmotic pressure and the production of killer toxins^{78–80}.

Finally, 10/40 of the fungal genera (*Acremonium*, *Aspergillus*, *Barnettozyma*, *Cryptococcus*, *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Priceomyces*, *Saccharomycopsis*, *Starmerella* and *Zygosaccharomyces*) were not detected at T0 2016 but exhibited implantation after the 2016 and/or 2017 harvests and certain of them persisted over time depending on the WREs (Fig. 5). The capacity of the genus *Aspergillus* to produce conidia⁸¹ and the antagonism activity of the genus *Acremonium*⁸² can explain their establishment in winery environment. Regarding the genus *Hanseniaspora*, the implantation and the persistence of 2 species of *Hanseniaspora* during 2 vintages has been previously demonstrated¹⁹. The genus *Priceomyces* has never been described in a winery environment before, only on grape berries⁴³. Nevertheless, this genus was detected over one year in brewery air⁸³. Thus, all yeast genera showed potential for implantation in all WREs and to become part of the established winery flora as well as the spoilage genus *Dekkera* previously described as a persistent genus in several steps of the winemaking process and in WREs^{84,85}. So, the implantation of all 10 genera can be explained by human activities (fermentation and/or transfer) in the winery and are considered as establishing winery flora (Fig. 5).

In conclusion, this work provided new insights into the establishment of the fungal consortium in a new winery. This fungal consortium consisted of persistent environmental flora that is not specific to the winery environment. These environmental flora included mold, filamentous fungi (e.g. *Alternaria*, *Didymella*) and yeasts (e.g. *Aureobasidium*, *Filobasidium*). Certain genera (e.g. *Candida*) were found before the arrival of the first harvest on one WREs, mainly on the winery floor, and persisted over time. Meanwhile, on the other WREs, the same genera were detected following the start of the harvest. Therefore, this finding suggests that these genera are well adapted to one specific environment of the winery and could be classified as persistent flora and/or establishing flora. However, during 2 vintages, the environmental flora was enriched by other fungal genera (e.g. *Acremonium*, *Hanseniaspora*). These genera were considered as establishing winery flora and are less adapted to the winery environment. Moreover, the majority of establishing flora are genera that present a fermentative metabolism that could also be a prerequisite state preventing their adaptation. Future works could be carried out to understand the mechanisms implicated in the establishment and persistence of this flora on the WRE of this new winery and more particularly, flora of enological interest.

Material and Methods

Facility description. All the samples were collected from a newly established winery located in Nuits-Saint-Georges (Bourgogne, France). The new winery was built in 2016 and started operating in September 2016. The winery covers a surface area of 1000 m² and is situated in an industrial zone with no surrounding vineyards. All the red wines from this winery were obtained exclusively from Pinot Noir grapes.

Sampling of wine-related environments (WREs). Samples were taken during three consecutive vintages (2016, 2017 and 2018). For the first vintage, 2016, the samples were collected at two separate time points: before the receipt of grapes (T0), three months after the end of the fermentations (T3), and from three different winery surfaces: floor (F), walls (W), equipment (E). At T0 time point, the majority of the equipment in the new winery was new, except for certain vats (36/108) that were formerly used in another winery. Therefore, the samples collected from the winery equipment (E) at T0 2016 were separated between used equipment (UE) and new

Winery environment	Floor	Walls	Equipment	Total number of samples per time point	Total number of samples /year	
Streaking surface	1 000 cm ²	1 000 cm ²	4 cm ²			
Number of samples	2016	40	40	40 (NE) + 40 (UE)*	160	280 (T0 + T3)
	2017	80	80	40	200	400 (T0 + T3)
	2018	80	80	40	200	200 (T0)

Table 3. Streaking surface and number of samples collected for each winery environment at a sampling time point. *NE (New Equipment) and UE (Used Equipment).

equipment (NE). The equipment sampled included lift conveyor belts, destemmers, presses, stainless steel vats, wooden vats, pumps, and transfer pipes.

For the samples collected after T0 2016, no separation between UE and NE was realized since all the equipment was in contact with the must and/or wine and therefore considered as UE.

For the 2017 vintage, the same sampling methodology was followed; however, to obtain more representative samples of the winery, the number was doubled for the samples collected from the floor and walls (Table 3). In the same way, the last samples were taken only at T0 of the 2018 harvest, which means that the sampling was carried out for two full years. All the samples were collected by streaking specific areas of each winery surface using sterile cotton swabs, which were then placed in an equivalent volume (40 mL for 40 samples) of physiological water solution (NaCl at 0.9% w/v).

A total of 280 samples (2016 vintage), 400 samples (2017 vintage) and 200 samples (T0 2018) were collected on all the winery surfaces (Table 3). Given this significant number, the samples were pooled to obtain average samples per environment and for each sampling time point. For example, for the 2016 vintage, the 40 samples from the floor at T0 were pooled to form an average sample. Thus, a total of 7 average samples (2016 vintage), 6 average samples (2017 vintage) and 3 average samples (T0 2018) were analyzed afterwards.

DNA extraction. 10 mL of each average sample was centrifuged at 4000 rpm for 4 min at 4 °C. The supernatant was discarded and the cell pellet was suspended in 200 µL of DNA-Yeast extraction buffer (2% Triton X-100 (v/v), 1% SDS (w/v), 100 mM NaCl, 10 mM Tris and 1 mM EDTA at pH 8). Then, 60 µL of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and 0.3 g of glass beads (0.5 mm in diameter; Scientific Industries) were added. The cells were lysed by Precellys 24-Dual (Bertin Technologies) for 3 × 45 s and placed on ice for 2 min. Afterwards, 200 µL of TE Buffer was added (10 mM Tris and 1 mM EDTA pH 8) and the mixture was centrifuged at 13 700 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was collected and the DNA was precipitated with 1 mL of 100% (v/v) ethanol solution and centrifuged at 13 700 rpm for 10 min at 20 °C. The DNA pellet was washed with 70% (v/v) ethanol solution and centrifuged at 13 700 rpm for 5 min at 20 °C. Finally, the DNA pellet was dried at 95 °C for 5 min to remove the excess ethanol and re-suspended in 40 µL of Milli-Q water and stored at −20 °C.

ITS amplicon library preparation. The nuclear ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of the fungal DNA was amplified for this analysis using a mono index approach. The fusion primers selected for this study were 5.8S-Fun (5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT-NNNNNNNNNN-AGTCAGTCAG-GG-AACTTYRRCAYGGATCWCT-3') and ITS4-Fun (5'-AATGATACGCGACCACCGAGATCTACAC-TATGGTAATT-AA-AGCCTCCGCTTATTGATATGCTTAART-3'). The fusion primers contained the 24- to 29-bp Illumina sequencing adaptor, the 12-bp Golay barcode (5.8S-Fun exclusively), a 10-bp primer pad, a 2-bp linker, and the 21- to 27-bp core primer (see Supplementary Table S1)⁸⁶.

PCR amplification was carried out in a final volume of 50 µL, including 2 µL DNA template, 0.3 µL of Platinum Taq DNA Polymerase 2.5 U (Invitrogen™, Waltham, MA, USA), 1 × Taq buffer, 20 µM dNTP and 1 µL of each primer 10 µM. The PCR program consisted in denaturing for 5 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 30 s at 94 °C, 1 min at 60 °C, 1 min at 72 °C and final extension at 72 °C for 5 min. Finally, the pooled PCR products were size-selected with an Invitrogen® 2% E-Gel, purified using the QIAquick purification kit (Qiagen, Germantown, MD). Their concentration was determined with the Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). The pooled PCR products were sequenced with an Illumina® MiSeq sequencer (2 × 300 cycles) (Illumina, San Diego, CA, USA). 20–25% PhiX control DNA was spiked in the run to add base diversity.

Sequence analysis. Data from Mi-Seq sequencing were analyzed with PIPITS, an automated pipeline for the detection and differentiation of fungal ITS⁸⁷ that produces Operational Taxonomic Unit (OTUs) abundance tables for each metagenomic sample.

Data availability

All relevant data are available upon request.

Received: 30 August 2019; Accepted: 15 April 2020;

Published online: 14 May 2020

References

- Amerine, M. A. & Kunkee, R. E. Microbiology of Winemaking. *Annual Review of Microbiology* 22, 323–358 (1968).
- Ivey, M. L. & Phister, T. G. Detection and identification of microorganisms in wine: a review of molecular techniques. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1619–1634 (2011).

3. Belda, I., Zarraonaindia, I., Perisin, M., Palacios, A. & Acedo, A. From Vineyard Soil to Wine Fermentation: Microbiome Approximations to Explain the “terroir” Concept. *Front. Microbiol.* **8**, 821, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00821> (2017).
4. Morgan, H. H., du Toit, M. & Setati, M. E. The Grapevine and Wine Microbiome: Insights from High-Throughput Amplicon Sequencing. *Front. Microbiol.* **8**, 820, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00820> (2017).
5. David, V. *et al.* High-throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 811–821 (2014).
6. Wang, C., García-Fernández, D., Mas, A. & Esteve-Zarzoso, B. Fungal diversity in grape must and wine fermentation assessed by massive sequencing, quantitative PCR and DGGE. *Front. Microbiol.* **6**, 1156, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01156> (2015).
7. Bokulich, N. A., Ohta, M., Richardson, P. M. & Mills, D. A. Monitoring Seasonal Changes in Winery-Resident Microbiota. *PLoS One* **8**, e66437, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066437> (2013).
8. Kecskeméti, E., Berkelmann-Löhnertz, B. & Reineke, A. Are Epiphytic Microbial Communities in the Carposphere of Ripening Grape Clusters (*Vitis vinifera* L.) Different between Conventional, Organic, and Biodynamic Grapes? *PLoS One* **11**, e0160852, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160852> (2016).
9. Mezzasalma, V. *et al.* Grape microbiome as a reliable and persistent signature of field origin and environmental conditions in Cannonau wine production. *PLoS One* **12**, e0184615, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184615> (2017).
10. Bokulich, N. A. *et al.* Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods.* **10**, 57–59 (2013).
11. Vezinhet, F., Hallet, J.-N. & Valade, M. & Poulard, A. Ecological Survey of Wine Yeast Strains by Molecular Methods of Identification. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**, 83–86 (1992).
12. Santamaría, P., Garijo, P., López, R., Tenorio, C. & Rosa Gutiérrez, A. Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: Effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *Int. J. Food Microbiol.* **103**, 49–56 (2005).
13. Mercado, L., Dalcerio, A., Masuelli, R. & Combina, M. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiol.* **24**, 403–412 (2007).
14. Blanco, P., Orriols, I. & Losada, A. Survival of commercial yeasts in the winery environment and their prevalence during spontaneous fermentations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 235–239 (2011).
15. Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M. & Dequin, S. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Res.* **7**, 317–329 (2007).
16. Ciani, M., Mannazzu, I., Marinangeli, P., Clementi, F. & Martini, A. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**, 159–164 (2004).
17. Grangeteau, C. Biodiversité fongique du raisin au vin: Impact de l'activité anthropique. PhD thesis, Université de Bourgogne Franche Comté, (2016).
18. Grangeteau, C. *et al.* Diversity of yeast strains of the genus *Hanseniaspora* in the winery environment: What is their involvement in grape must fermentation? *Food Microbiol.* **50**, 70–77 (2015).
19. Grangeteau, C. *et al.* Persistence of Two Non-*Saccharomyces* Yeasts (*Hanseniaspora* and *Starmerella*) in the Cellar. *Front. Microbiol.* **7**, 268, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00268> (2016).
20. Bruyas, P. Area under vines in the EU down by 15.7% between 1989 and 1999. www.publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/971742b5-1a0f-4772-ba5a-345e41844619. (2003).
21. Wines Vines Analytics. U.S. Wineries Statistics. www.winesvinesanalytics.com/statistics/winery/. (2018)
22. Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A. & Guillamón, J. M. Analysis of Yeast Populations During Alcoholic Fermentation in a Newly Established Winery. *Am. J. Enol. Vitic.* **48**, 339–344 (1997).
23. Beltran, G. *et al.* Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**, 287–293 (2002).
24. Clavijo, A., Calderón, I. L. & Paneque, P. Effect of the use of commercial *Saccharomyces* strains in a newly established winery in Ronda (Málaga, Spain). *Antonie Van Leeuwenhoek* **99**, 727–731 (2011).
25. Pretorius, I. S., Westhuizen, T., Jvander & Augustyn, O. P. H. Yeast Biodiversity in Vineyards and Wineries and Its Importance to the South African Wine Industry: A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **20**, 61–70 (1999).
26. Bisson, L. F. & Joseph, C. M. L. Yeasts, in *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (eds König, H., Uden, G. & Fröhlich, J.) 47–60 (Springer Berlin Heidelberg, <https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0-3> 2009).
27. Diaz, C., Molina, A. M., Nöhling, J. & Fischer, R. Characterization and Dynamic Behavior of Wild Yeast during Spontaneous Wine Fermentation in Steel Tanks and Amphorae. *BioMed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2013/540465> (2013).
28. Hendgen, M. *et al.* Effects of different management regimes on microbial biodiversity in vineyard soils. *Scientific Reports* **8**, 9393, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27743-0> (2018).
29. Drumonde-Neves, J., Franco-Duarte, R., Lima, T., Schuller, D. & Pais, C. Yeast Biodiversity in Vineyard Environments Is Increased by Human Intervention. *PLoS One* **11**, e0160579, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160579> (2016).
30. Heather, J. M. & Chain, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* **107**, 1–8 (2016).
31. Grinn-Gofroń, A. & Strzelczak, A. Changes in concentration of *Alternaria* and *Cladosporium* spores during summer storms. *Int. J. Biometeorol.* **57**, 759, <https://doi.org/10.1007/s00484-012-0604-0> (2013).
32. Ocón, E. *et al.* Factors of influence in the distribution of mold in the air in a wine cellar. *J. Food Sci.* **76**, M169–174, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02097.x>. (2011).
33. Coppock, J. B. M. & Cookson, E. D. The effect of humidity on mould growth on constructional materials. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2**, 534–537 (1951).
34. Pasanen, A.-L., Pasanen, P., Jantunen, M. J. & Kallioikoski, P. Significance of air humidity and air velocity for fungal spore release into the air. *Atmospheric Environment. Part A. General Topics* **25**, 459–462 (1991).
35. Johansson, P., Ekstrand-Tobin, A., Svensson, T. & Bok, G. Laboratory study to determine the critical moisture level for mould growth on building materials. *International Biodeterioration & Biodegradation* **73**, 23–32 (2012).
36. Landell, M. F. *et al.* *Hannaella pagnoccae* sp. nov., a tremellaceous yeast species isolated from plants and soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**, 1970–1977 (2014).
37. Summerbell, R. C. The heterobasidiomycetous yeast genus *Leucosporidium* in an area of temperate climate. *Can. J. Bot.* **61**, 1402–1410 (1983).
38. Vadkertiová, R., Dudášová, H. & Balaščíková, M. Yeasts in Agricultural and Managed Soils. in *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity* (eds Buzzini, P., Lachance, M. A. & Yurkov, A.) 117–144 (Springer International Publishing, 2017).
39. Yurkov, A. M., Schäfer, A. M. & Begerow, D. *Leucosporidium drummii* sp. nov., a member of the Microbotryomycetes isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 728–734 (2012).
40. Theisinger, S. M. & Smidt, O. de S. Bioaerosols in the Food and Beverage Industry. *Ideas and Applications Toward Sample Preparation for Food and Beverage Analysis* <https://doi.org/10.5772/intechopen.69978> (2017).
41. Mensah-Attipoe, J. & Toyinbo, O. Fungal Growth and Aerosolization from Various Conditions and Materials. in *Fungal Infection* (ed. Silva de Loreto, E.) (IntechOpen, 2019).
42. Ramos, S. & García Acha, I. A vegetative cycle of *Pullularia pullulans*. *Transactions of the British Mycological Society* **64**, 129–135 (1975).

43. Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., Gil-Díaz, M. & Arroyo, T. Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *Eur. Food Res. Technol.* **236**, 193–207 (2013).
44. Ocón, E., Gutiérrez, A. R., Garijo, P., López, R. & Santamaría, P. Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. *Food Microbiol.* **27**, 1023–1027 (2010).
45. Flannigan, B. Microorganisms in indoor air. In *Microorganisms in Home and Work Environments: Diversity, Health Impacts, Investigation and Control* (eds Samson, R. A., Miller, J. D. & Flannigan, B.) 27–47 (Taylor & Francis, 2001).
46. Nagahama, T. Yeast Biodiversity in Freshwater, Marine and Deep-Sea Environments. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (eds Péter, G. & Rosa, C.) 241–262 (Springer Berlin Heidelberg, 2006).
47. Egbuta, M. A., Mwanza, M. & Babalola, O. O. A Review of the Ubiquity of Ascomycetes Filamentous Fungi in Relation to Their Economic and Medical Importance. *Advances in Microbiology* **6**, 1140–1158 (2016).
48. Thomma, B. P. H. J. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Mol. Plant Pathol.* **4**, 225–236 (2003).
49. Logrieco, A., Moretti, A. & Solfrizzo, M. *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal* **2**, 129–140 (2009).
50. Rotem, J. *The genus Alternaria: biology, epidemiology, and pathogenicity*. (American Phytopathological Society, 1994).
51. Musetti, R. et al. Inhibition of Sporulation and Ultrastructural Alterations of Grapevine Downy Mildew by the Endophytic Fungus *Alternaria alternata*. *Phytopathology* **96**, 689–698 (2006).
52. Singh, R., Gaur, R., Tiwari, S. & Gaur, M. K. Production of pullulan by a thermotolerant *Aureobasidium pullulans* strain in non-stirred fed batch fermentation process. *Braz. J. Microbiol.* **43**, 1042–1050 (2012).
53. Malfeito-Ferreira, M. Spoilage Yeasts in Red Wines. In *Red Wine Technology* (ed Morata, A.) 219–235 (Academic Press, 2019).
54. Fleet, G. H., Prakitichaiwattana, C., Beh, A. L. & Heard, G. M. The yeast ecology of wine grapes. In *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts* (ed Ciani, M.) 1–17 (Research Signpost, 2002).
55. Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B. & Guillamón, J. M. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol. Res.* **157**, 267–274 (2002).
56. Gostinčar, C., Grube, M. & Gunde-Cimerman, N. Evolution of fungal pathogens in domestic environments? *Fungal Biol.* **115**, 1008–1018 (2011).
57. Kaewwichian, R., Limtong, S., Am-In, S., Jindamorakot, S. & Sipiczki, M. *Hannaella siamensis* sp. nov. and *Hannaella phetchabunensis* sp. nov., two new anamorphic basidiomycetous yeast species isolated from plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**, 1297–1303 (2015).
58. Flannigan, B. Air sampling for fungi in indoor environments. *Journal of Aerosol Science* **28**, 381–392 (1997).
59. Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J. Z. & Crous, P. W. The genus *Cladosporium*. *Stud Mycol* **72**, 1–401 (2012).
60. Baxter, D. M., Perkins, J. L., McGhee, C. R. & Seltzer, J. M. A Regional Comparison of Mold Spore Concentrations Outdoors and Inside “Clean” and “Mold Contaminated” Southern California Buildings. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene* **2**, 8–18 (2005).
61. Basílico, M. et al. Influence of environmental factors on airborne fungi in houses of Santa Fe City, Argentina. *Science of The Total Environment* **376**, 143–150 (2007).
62. Hawker, L. E. & Hendy, R. J. An Electron-Microscope Study of Germination of Conidia of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology* **33**, 43–46 (1963).
63. Kim, W. K. et al. Six Species of *Penicillium* Associated with Blue Mold of Grape. *Mycobiology* **35**, 180–185 (2007).
64. Sempere, F. & Santamarina, M. P. The conidia formation of several *Fusarium* species. *Annals of Microbiology* **59**, 663–674 (2009).
65. Mašínová, T. et al. Drivers of yeast community composition in the litter and soil of a temperate forest. *FEMS Microbiol. Ecol.* **93**, fiw223, <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw223> (2017).
66. Atkin, C. L., Neilands, J. B. & Phaff, H. J. Rhodotorulic acid from species of *Leucosporidium*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, and *Sporobolomyces*, and a new alanine-containing ferrichrome from *Cryptococcus melibiosus*. *J. Bacteriol.* **103**, 722–733 (1970).
67. Skinner, F. A., Passmore, S. M. & Davenport, R. R. Biology and activities of yeasts. (London Academic Press, 1980).
68. ONishi, H. Osmophilic Yeasts. In *Advances in Food Research* (eds Chichester, C. O., Mraak, E. M. & Stewart, G. F.) 53–94 (Academic Press, 1963).
69. Buzzini, P., Branda, E., Goretti, M. & Turchetti, B. Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. *FEMS Microbiol. Ecol.* **82**, 217–241 (2012).
70. Zaky, A. S., Tucker, G. A., Daw, Z. Y. & Du, C. Marine yeast isolation and industrial application. *FEMS Yeast Res.* **14**, 813–825 (2014).
71. Loureiro, V. & Malfeito-Ferreira, M. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int. J. Food Microbiol.* **86**, 23–50 (2003).
72. Sibirnyi, A. A., Zharova, V. P., Kshanovskaia, B. V. & Shavlovskii, G. M. Selection of a genetic strain of *Pichia guilliermondii* yeasts capable of forming a significant quantity of spores. *Tsitol. Genet.* **11**, 330–333 (1977).
73. Vaughan-Martini, A., Kurtzman, C. P., Meyer, S. A. & O'Neill, E. B. Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascospore state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov. *FEMS Yeast Res.* **5**, 463–469 (2005).
74. Urszula, B., Pawel, S. & Pawel, S. The influence of *Pichia* killer toxins on the wine spoilage yeasts. *Potravinárstvo* (2015).
75. Sipiczki, M. *Metschnikowia* Strains Isolated from Botrytized Grapes Antagonize Fungal and Bacterial Growth by Iron Depletion. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 6716–6724 (2006).
76. Türkel, S. & Ener, B. Isolation and characterization of new *Metschnikowia pulcherrima* strains as producers of the antimicrobial pigment pulcherrimin. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* **64**, 405–410 (2009).
77. Kurtzman, C. P. Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **99**, 13–23 (2011).
78. Comitini, F. et al. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**, 235–240 (2004).
79. Passoth, V., Fredlund, E., Druvefors, U. A. & Schnürer, J. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Res.* **6**, 3–13 (2006).
80. Fernández de Ullivarri, M., Mendoza, L. M. & Raya, R. R. Characterization of the killer toxin KTCf20 from *Wickerhamomyces anomalus*, a potential biocontrol agent against wine spoilage yeasts. *Biological Control* **121**, 223–228 (2018).
81. Atoui, A., Mitchell, D., Mathieu, F., Magan, N. & Lebrihi, A. Partitioning of ochratoxin A in mycelium and conidia of *Aspergillus carbonarius* and the impact on toxin contamination of grapes and wine. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 961–968 (2007).
82. Lo Piccolo, S. et al. Identification of *Acremonium* isolates from grapevines and evaluation of their antagonism towards *Plasmopara viticola*. *Ann. Microbiol.* **65**, 2393–2403 (2015).
83. Spitaels, F. et al. The Microbial Diversity of Traditional Spontaneously Fermented Lambic Beer. *PLoS One* **9**, e95384, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095384> (2014).
84. Renouf, V., Miot-Sertier, C., Perello, M.-C., Revel, G. de & Lonvaud-Funel, A. Evidence for differences between *B. bruxellensis* strains originating from an enological environment. *International Journal of Wine Research* <https://doi.org/10.2147/IJWR.S4612> (2009).
85. Suárez, R., Suárez-Lepe, J. A., Morata, A. & Calderón, F. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry* **102**, 10–21 (2007).
86. Taylor, D. L. et al. Accurate Estimation of Fungal Diversity and Abundance through Improved Lineage-Specific Primers Optimized for Illumina Amplicon Sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 7217–7226 (2016).

87. Gweon, H. S. *et al.* PIPITS: an automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. *Methods in Ecology and Evolution* 6, 973–980 (2015).

Acknowledgements

This work was supported by the Regional Council of Bourgogne- Franche-Comté, the “Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)” and the “Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB)”. The authors would like to thank the wine company who provided the facility in which this study was realized.

Author contributions

H.Ab. performed the experiments, conducted filed work, analyzed the data, constructed the figures and wrote the manuscript; C.R.C. performed the experiments; M.V. contributed to manuscript revision; P.D. analyzed the sequencing data; H.A.I. contributed to manuscript revision; M.G.B. conducted filed work and contributed to manuscript revision; S.R. designed the experiment, conducted filed work and wrote the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64819-2>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.R.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

Chapitre 4 : Colonisation de l'environnement
d'une nouvelle cuverie par l'espèce
Saccharomyces cerevisiae

La première étape clé du processus de vinification est la fermentation alcoolique (FA). Plusieurs pratiques œnologiques peuvent être employées pour réaliser la FA : (i) utiliser des levures commerciales, (ii) travailler en levures indigènes ou (iii) utiliser des pieds de cuve. A l'heure actuelle, la majorité des travaux existants se sont focalisés sur l'étude de la dynamique des souches de *S. cerevisiae* au cours de FA initiées par des levures commerciales ou de FA spontanées. Ces travaux, réalisés dans des cuveries en production, ont démontré que certaines souches commerciales ou indigènes étaient capables de coloniser l'environnement de la cuverie et ensuite de s'implanter dans les futurs moûts/vins (Santamaría *et al.*, 2005 ; Mercado *et al.*, 2007 ; Santamaría *et al.*, 2008). Par contre, une seule étude décrit la dynamique de souches de *S. cerevisiae* lors de fermentations réalisées avec des pieds de cuve (Clavijo *et al.*, 2011a). Les auteurs ont mis en évidence, dans une cuverie en production, la capacité de certaines souches indigènes isolées d'un pied de cuve à s'implanter, non seulement dans les moûts inoculés par le pied de cuve, mais également dans les moûts non-inoculés. La dissémination des souches originaires du pied de cuve dans l'environnement de la cuverie serait à l'origine de la présence de ces souches dans les moûts non inoculés. A notre connaissance, aucune étude n'a porté sur la dissémination des souches de *S. cerevisiae* provenant d'un pied de cuve dans l'environnement d'une nouvelle cuverie et leur capacité à persister dans cet environnement.

Pour persister dans des conditions environnementales stressantes comme celles d'une cuverie, les microorganismes (notamment les levures) peuvent mettre en place différents mécanismes. Le mode de vie biofilm est décrit comme un mécanisme permettant de mieux s'adapter aux conditions environnementales (Davey et O'Toole, 2000 ; Bastard *et al.*, 2016). Néanmoins, à l'heure actuelle, aucune étude n'a porté sur la capacité de souches de levures à former des biofilms et à persister dans l'environnement d'une cuverie.

En se basant sur ce contexte, l'objectif de cette partie de thèse était d'étudier la colonisation de l'environnement d'une nouvelle cuverie par les levures indigènes *S. cerevisiae*. Plus particulièrement, le but de ce travail était de trouver l'origine des souches colonisant les surfaces de la nouvelle cuverie après les premières fermentations alcooliques dont certaines étaient réalisées avec un pied de cuve. Est-ce que les souches persistantes dans l'environnement sont originaires des moûts et du vin au cours des FA et/ou originaires du pied de cuve utilisé ? Enfin, dans le but d'étudier si la formation de biofilms est un facteur qui pourrait contribuer à la persistance de *S. cerevisiae* dans l'environnement de la cuverie, une comparaison de la capacité à former des biofilms a été réalisée pour des souches « colonisatrices » et des souches présentes ponctuellement.



Article

Colonization of Wild *Saccharomyces cerevisiae* Strains in a New Winery

Hany Abdo ¹, Claudia R. Catacchio ², Mario Ventura ², Pietro D'Addabbo ²,
Francesco Maria Calabrese ², Julie Laurent ¹, Vanessa David-Vaizant ¹, Hervé Alexandre ¹,
Michèle Guilloux-Bénatier ¹ and Sandrine Rousseaux ^{1,*}

- ¹ Université Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France-IUVV Equipe VAIMiS, rue Claude Ladrey, CEDEX BP 27877, 21078 Dijon, France; hany.abdo@u-bourgogne.fr (H.A.); julie.laurent@u-bourgogne.fr (J.L.); vanessa.david@u-bourgogne.fr (V.D.-V.); rvalex@u-bourgogne.fr (H.A.); mgb@u-bourgogne.fr (M.G.-B.)
- ² Department of Biology, University of Bari, 70125 Bari, Italy; claudiarita.catacchio@uniba.it (C.R.C.); mario.ventura@uniba.it (M.V.); pietro.daddabo@uniba.it (P.D.A.); frankof.calabrese@gmail.com (F.M.C.)
- * Correspondence: Sandrine.rousseau@u-bourgogne.fr; Tel.: +33-380-396-261

Received: 19 November 2019; Accepted: 5 February 2020; Published: 12 February 2020



Abstract: The aim of this work was to study the fungal colonization of a new winery over time, specifically for *Saccharomyces cerevisiae*. Therefore, we analyzed the flora present before the arrival of the first harvest on the floor, the walls and the equipment of this new winery by Illumina MiSeq. The genus *Saccharomyces* ($\leq 0.3\%$) was detected on floor and equipment but the presence of *S. cerevisiae* species was not reported. Wild *S. cerevisiae* strains were isolated from a 'Pied de Cuve' used during the first vintage to ensure the alcoholic fermentation (AF). Among 25 isolates belonging to this species, 17 different strains were identified highlighting a great intraspecific diversity. *S. cerevisiae* strains were also isolated from different vats throughout the spontaneous fermentations during the first vintage. The following year, some of these strains were isolated again during AF. Some of them (four) were found in the winery equipment before the arrival of the third harvest suggesting a potential colonization by these strains. To better understand what promotes the yeast colonization of the winery's environment, the ability to form a biofilm on solid surfaces for eight colonizing or non-colonizing strains was studied. This capacity, different according to the strains, could partly explain the colonization observed for certain strains.

Keywords: new winery; Pied de Cuve; wine-related environment; *Saccharomyces cerevisiae*; biofilms

1. Introduction

In the winemaking process, several practices are used worldwide to ensure the alcoholic fermentation (AF). These practices include the use of commercial starters of active dry yeast (ADY), spontaneous fermentations and the method of 'Pied de Cuve'. The use of commercial starters of ADY has become one of the most common practices in winemaking worldwide [1,2]. In fact, this technique ensures (i) faster AF, (ii) production of desirable metabolites and (iii) reduction of the risk of wine spoilage [3–5]. For spontaneous fermentations, this practice relies on the natural fermentation of grape juice by the yeasts found on grape berries and winery environment. It has been demonstrated that the use of this practice positively impacts the sensory characteristics of wine and enhances its complexity due to the succession of multiple non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* species [6–10]. However, this uncontrolled biological process can result in a stuck or sluggish AF and increases the risk of wine spoilage due to the development of undesirable yeasts or bacteria [11,12]. To minimize the risks linked to spontaneous fermentations, winemakers can use a special method called 'Pied de Cuve' [13–16].

Depending on the winemaking techniques, the 'Pied de Cuve' can be prepared using indigenous yeast flora or commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. In the case of 'Pied de Cuve' prepared using indigenous yeast flora, grapes are collected, pressed and the must is fermented. Once at the beginning of AF, the 'Pied de Cuve' is inoculated into a new must. Thus, the 'Pied de Cuve' method applies viable yeast cells to start a new fermentation and promotes the growth of yeasts with good fermentation characteristics [16].

The majority of works has mainly studied the effect of the use of ADY *S. cerevisiae* strains on AF [17,18], but the implantation of ADY strains on wine-related environments (WREs) has also been highlighted [19,20]. Although no longer used, commercial starters of *S. cerevisiae* persist in winery ecosystem for one year and colonize new must even after two years [19]. As for ADY strains, during spontaneous AF the presence of wild strains on the WREs of wineries and their involvement during the AF of the same year was also described [20,21]. Plus, Grangeteau [22] demonstrated that some wild strains, originating from grape berries, are able to implement during the AF. However, the persistence of wild *S. cerevisiae* on WREs and their implantation during future fermentations has not been demonstrated yet. According to the literature, if implantation of wild yeasts brought by the 'Pied de Cuve' during spontaneous AF of the same year has been demonstrated [14], their persistence on the WREs is still not clearly established [13–16]. Nevertheless, all the above-mentioned works were carried out in wineries in production: dynamics, implantation and persistence of *S. cerevisiae* strains in a new winery are subjects that have not been extensively studied. To our knowledge, only three studies have been conducted in newly established wineries, but these new wineries used commercial yeasts [23–25]. Thus, no data are available concerning the involvement of spontaneous fermentations and/or the 'Pied de Cuve' method in the colonization and persistence of *S. cerevisiae* strains on WREs in a new winery.

The persistence of microorganisms under stressful environmental conditions such as winery environments can be due to multiple mechanisms. For example, the ability to kill or inhibit other microorganisms (yeast and/or bacteria) by the production of killer toxins is a strategy of persistence for *S. cerevisiae* in the environment [26,27]. Another potential strategy is the capacity of *S. cerevisiae* to enter in viable but non culturable (VBNC) state when environmental conditions become stressful [28]. Indeed, biofilm mode of life is described as strategy allowing microorganisms to better adapt to environmental conditions [29–31]. The adhesion properties of commercial strains on winery hose have been demonstrated and can contribute to the persistence of these yeasts in winery environment and to their potential implantation in uninoculated fermentations [32].

Based on this context, wine related environments (WREs) can be considered as an important ecological niche for yeast flora that can also be implicated during winemaking. Thus, this study aimed to understand how a new winery can be colonized by yeasts with several objectives: (i) identify wild *Saccharomyces cerevisiae* strains present in the environment of a new winery (floor, walls and equipment) before the arrival of the first harvest, (ii) highlight the colonization of the winery's environments by strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated in the PDC made in the first year or isolated from the musts and wines of two consecutive vintages, (iii) compare the ability to form biofilms between "colonizing" strains and punctually present strains.

2. Material and Methods

2.1. Sampling of Winery Related Environments (WREs)

Samples were taken during three consecutive vintages (2016, 2017 and 2018) in a new winery located in Nuits-Saint-Georges (Bourgogne, France). The samples were collected from three different winery environments (WREs): floor (F), walls (W), equipment (E). Two sampling times were selected: before the receipt of grapes in the winery (T0) and three months after the end of the fermentations (T3) to observe if yeast strains have been able to implant or colonize the WREs while the activity of the winery is low. For the 2016 vintage, at T0 time point, the majority of the equipment in the new winery was new, except for certain vats (36/108) that have already been used before. The equipment

sampled included lift conveyor belts, destemmers, presses, stainless steel vats, wooden vats, pumps, and transfer pipes. For the 2017 vintage, the same sampling methodology was followed with two sampling times T0 and T3. The sampling was carried out for two full years (from T0 2016 to T0 2018), so sampling for the vintage 2018 was realized before the arrival of the harvest (T02018). All the samples were collected by streaking specific areas of each WRE using sterile cotton swabs, which were then placed in an equivalent volume (40 mL for 40 samples) of physiological water solution (NaCl at 0.9% *w/v*).

Given the significant number of samples realized by vintage at each sampling time, the samples were pooled to obtain average samples (per environment and for each sampling time point). For example, for the 2016 vintage, the 40 samples from the floor at T0 were pooled to form an average sample. Thus, a total of 7 average samples for 2016 vintage (floor, walls, new equipment, used equipment at T0, floor, walls, equipment at T3), 6 average samples for 2017 vintage (floor, walls, equipment at T0 and at T3) and 3 average samples for 2018 vintage (floor, walls, equipment at T0) were analyzed afterwards.

2.2. "Pied de Cuve" (PDC)

To ensure the spontaneous fermentations in the new winery, a PDC for 2016 was prepared by allowing 800 Kg of Pinot Noir must to ferment spontaneously. To study the PDC's biodiversity: samples were collected at three different time points: before SO₂ addition, 36 h after SO₂ addition (3 g/hL) and 7.5 days after SO₂ addition (*d*= 1.09). The PDC served for the inoculation of one fermentation vat (vat A) containing 31 hL of must from the same appellation (Table 1).

Table 1. Name and must appellation of each fermentation vats followed throughout the 2016 and 2017 vintages.

Name of Fermentation Vat		Must Appellation
2016 Vintage	2017 Vintage	
Pied de Cuve	-	Beaune 1er Cru—Clos de l'Ecu
A	A	
B	B and B'	Volnay 1er Cru—Fremiets
C	C	Monthélie 1er Cru—Champs Fulliot

2.3. Must/Wine Samples

The first vinification took place in the new winery during the 2016 vintage. Must and wine samples were collected from three different fermentation vats (A, B and C) containing musts from different appellations (Table 1). Samples were collected in fresh musts and before inoculation by PDC in the vat A (T0) and at end of fermentation (E-AF) when the density kept constant (≈ 0.99). Must and wine samples were collected and shipped on ice to the lab for plating and further analysis.

The same sampling methodology was followed during the 2017 vintage but no PDC were set-up to initiate the alcoholic fermentation during this year. Four different fermentation vats (A, B, B' and C) were followed-up during the second vintage. The vats A, B, B' and C contained must from the same appellations as the 2016 vintage (Table 1). Two sampling time points were considered: fresh must (T0) and end of the fermentation (E-AF).

2.4. Illumina Sequencing

2.4.1. DNA Extraction

A total of 10 mL of each average sample was centrifuged at 4000 rpm for 4 min at 4 °C. The supernatant was discarded, and the cell pellet was suspended in 200 μ L of DNA-Yeast extraction buffer (2% Triton X-100 (*v/v*), 1% SDS (*w/v*), 100 mM NaCl, 10 mM Tris and 1 mM EDTA at pH 8). Then,

60 µL of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and 0.3 g of glass beads (0.5 mm in diameter; Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) were added. The cells were lysed by Precellys 24-Dual (Bertin Technologies, Montigny le Bretonneaux, France) for 3 × 45 s and placed on ice for 2 min. Afterwards, 200 µL of TE Buffer was added (10 mM Tris and 1 mM EDTA pH 8) and the mixture was centrifuged at 13700 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was collected and the DNA was precipitated with 1 mL of 100% (v/v) ethanol solution and centrifuged at 13700 rpm for 10 min at 20 °C. The DNA pellet was washed with 70% (v/v) ethanol solution and centrifuged at 13700 rpm for 5 min at 20 °C. Finally, the DNA pellet was dried at 95 °C for 5 min to remove the excess ethanol and re-suspended in 40 µL of Milli-Q water and stored at –20 °C.

For must/wine samples, a filtration step was carried out prior to DNA extraction using a polyamide column (2.5 g of MN Polyamid SC6 Macherey-Nagel, Düren, Germany). The column was rinsed with NaCl 1M solution and then 10 mL of each must/wine sample were collected and filtered through it. The filtered suspension was centrifuged at 13,700 rpm for 4 min at 4 °C.

2.4.2. ITS Amplicon Library Preparation

The nuclear ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of the fungal DNA was amplified for this analysis in a one-step amplification protocol using a mono index approach. The fusion primers selected for this study were the 5.8S-Fun (5'-CAAGCAGAAGACGGCATA CAGAT-NNNNNNNNNN-AGTCAGTCAG-GG-**AACTTTYRRC AAYGGATCWCT**-3') and the ITS4-Fun (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-TATGGTAATT-AA-**AGCCTCCGCTTAT TGATATGCTTAART**-3') (core PCR primer in bold). The fusion primers contained the 24-to 29-bp Illumina sequencing adaptor, the 12-bp Golay barcode (5.8S-Fun exclusively), a 10-bp primer pad, a 2-bp linker, and the 21-to 27-bp core primer. The different elements are separated by dashes, and Golay barcodes are shown as Ns [33].

PCR amplification was carried out in a final volume of 50 µL, including 2 µL DNA template, 0.3 µL of Platinum Taq DNA Polymerase 2.5 U (Invitrogen™, Waltham, MA, USA), 1 × Taq buffer, 20 µM dNTP and 1 µL of each primer 10 µM. The PCR program consisted in denaturing for 5 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 30 s at 94 °C, 1 min at 60 °C, 1 min at 72 °C and final extension at 72 °C for 5 min. Finally, the pooled PCR products were size-selected with an Invitrogen® 2% E-Gel, purified using the QIAquick purification kit (Qiagen, Germantown, MD, USA). Their concentration was determined with the Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientifics, Waltham, MA, USA). The pooled PCR products were sequenced with an Illumina® MiSeq sequencer (2 × 300 cycles) following manufacturer's instructions (Illumina, San Diego, CA, USA). Final libraries were diluted to 4–6 pM before loading and 20–25% PhiX control DNA was spiked in the run to add base diversity.

2.4.3. Sequence Analysis

Data from MiSeq sequencing were analyzed with PIPITS, an automated pipeline for the detection and differentiation of fungal internal transcribed spacer (ITS) [34]. Raw data were demultiplexed and barcodes and primers were trimmed off. Quality filters were applied, using a FASTX Toolkit. High-quality reads were clustered into operational taxonomic units (OTUs) at 97% similarity using VSEARCH and chimaeras excluded using also VSEARCH [35]. Taxonomy was assigned with RDP Classifier [36] against the UNITE fungal ITS reference dataset [37]. Finally, relative abundances of fungal taxa in each sample were calculated and compared. The results have been published in a public database (accession code: bioproject_accession PRJNA603502).

2.5. Yeast Isolation

Colony counting on plates were carried out for each average samples taken from PDC, must, wine and winery surfaces according to the protocol described by Grangeteau et al. [38]. After incubation, up to 50 yeast colonies were randomly selected and isolated at each sampling time point from plates

containing between 30–300 colonies. The isolates obtained throughout this work were stored in glycerol (25%, *v/v*) at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for later identification.

2.6. Molecular Identification of Yeast Isolates

2.6.1. ITS-PCR

DNA extraction was realized from fresh colonies as previously described by Werner et al. [39]. Briefly, one colony was mixed with 40 μL of NaOH solution (20 mM) and heated for 10 min at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. After centrifugation at 4000 rpm for 10 min, the pellet was discarded and the supernatant containing the DNA was preserved for PCR analysis.

Internal transcribed spacer (ITS) 5.8S rDNA region was amplified using the primers ITS1 and ITS4 for differentiation between *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* isolates [40]. PCR conditions were followed as previously described by Esteve-Zarzoso et al. [41]. PCR products were separated by microchip electrophoresis (MultiNA MCE202, Shimadzu, Tokyo, Japan).

2.6.2. Interdelta PCR Typing

Intra-specific diversity among the *S. cerevisiae* isolates was studied by interdelta analysis. Primers $\delta 12$ and $\delta 21$ were used and the PCR reaction was performed as previously described by Legras and Karst [42]. Interdelta profiles were analyzed and visualized by microchip electrophoresis (MultiNA MCE202, Shimadzu, Tokyo, Japan).

2.7. Biofilm Formation of *S. cerevisiae*

Biofilm formation was monitored for 8 selected strains of *S. cerevisiae* isolated during this study. In addition, one commercial strain of *S. cerevisiae* (Lalvin Rhône 2056), known for its capacity to form biofilms, was added to this study as a positive control [32,43].

From $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ stored cultures, starter cultures of *S. cerevisiae* were prepared in triplicates into 1.5 mL of YPD medium at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ during 24 h. Then, the starter cultures were passed twice into fresh medium to obtain cultures in the same physiological state. Then, cell suspensions were readjusted at $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.05$ ($1\text{ OD}_{600\text{nm}} = 1.0 \times 10^7\text{ CFU/mL}$) in YPD medium to obtain the "YPD working culture".

Biofilm formation was studied on stainless steel chips using a protocol previously described by Bastard et al. [31] and adapted to the yeast *S. cerevisiae*. Stainless-steel chips (25 mm \times 25 mm, Goodfellow, 316L, France) were immersed in 13 mL of "YPD working culture" adjusted at $1.2 \times 10^5\text{ CFU/mL}$ and incubated for 2, 24 and 48 h at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. After incubation, chips were collected and rinsed twice 30 s in 15 mL of sterile physiological water to eliminate non-adhered cells on chips. Afterwards, chips were placed in a new sterile physiological water (15 mL) and cells were detached by sonication (Bransonic CPXH1800H-E; Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CT, USA) for 3 min. The detached cells from chips and contained in the cell suspension were numbered by plating on YPD plates at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ after serial dilutions. This experiment was also realized in three independent biological repetitions for each strain.

2.7.1. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The 48 h-aged biofilms were formed on stainless steel chips. Cells were directly fixed on stainless steel by a solution of 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 for 3 h at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The samples were then washed with 0.05 mM phosphate buffer for 10 min at room temperature. Dehydration was performed by two successive immersions for 10 min in solutions of increasing ethanol content (30, 50, 70, 90, 100%). Then, multiple baths of ethanol-acetone solution (70:30, 50:50, 30:70, 100%) were realized during 10 min for each mixture. Then, the chips were air-dried and stored at room temperature. Afterward, the samples were coated with a thin gold layer using an Edwards Scancoat Six Pirani 201 sputter coater (Edwards High Vacuum, Crawley, England) and then observed with a

Hitachi SU1510 scanning electron microscope (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokyo, Japan). SEM was performed at an accelerating voltage of 15 kV using a working distance between 7.5 mm.

2.7.2. Statistical Analysis

All biofilm assays were performed in three biological replicates. A one-way analysis of variance (ANOVA) with a post-hoc Tukey honestly significant difference (HSD) test was used for statistical comparison. A p -value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

3. Results and Discussion

3.1. *Saccharomyces* Status in the New Winery before the Arrival of the First Harvest

The status of the *Saccharomyces* genus in a new winery was studied in order to provide new knowledge on the presence of this genus on the WREs of a new winery, which has never been studied before. Thus, samples from three different WREs (floor, walls and equipment) were collected before the arrival of the first harvest and analyzed by Illumina MiSeq. The genus *Saccharomyces* was only detected on winery floor and used equipment at very low percentages ($\leq 0.3\%$) compared to the higher percentage of non-*Saccharomyces* yeast genera (24 genera) detected on the three WREs (Table 2). The presence of genus *Saccharomyces* on the equipment is not surprising considering that certain vats (36/108) had already been used before. So, the presence of the genus *Saccharomyces* can be linked to must and/or wine residues found particularly in areas that are difficult to clean. The detection of this genus on the winery floor could be explained by the potential transfer between used equipment and winery floor due to human activities. This result confirms that genus *Saccharomyces* is a genus related to fermentation activity and not a ubiquitous genus of the winery environment [44–46].

Table 2. Percentages of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* genera identified on wine-related environments (WREs) before the arrival of the first harvest by Illumina sequencing.

Yeast Genus	T0 2016		
	Floor	Walls	Equipment
Non- <i>Saccharomyces</i> *	99.7	100.0	99.9
<i>Saccharomyces</i>	0.3	0.0	0.1

* Identified non-*Saccharomyces* genera: *Aureobasidium*, *Barnettozyma*, *Bullera*, *Candida*, *Curvibasidium*, *Cryptococcus*, *Cystobasidium*, *Debaryomyces*, *Filobasidium*, *Hanseniaspora*, *Holtermanniella*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma*, *Nakazawaea*, *Pichia*, *Rhodospordiobolus*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Solicocozyma*, *Torula*, *Trigonopsis*, *Vishniacozyma* and *Wickerhamomyces*.

Despite the low representation of the genus *Saccharomyces*, we investigated whether these consisted of the species *Saccharomyces cerevisiae* by identification of the isolates by PCR-ITS. None of the isolates analyzed belonged to this species, probably too minor to be detected by the strategy employed. Moreover, detection of this genus by Illumina MiSeq can be linked to the sequencing of DNA from dead cells or cells in viable but non-culturable (VBNC) state, previously demonstrated for *S. cerevisiae* [28].

3.2. Yeast Biodiversity in 'Pied de Cuve' (PDC)

A 'Pied de Cuve' was prepared and samples were collected at three different time points (before SO₂ addition, 36 h after SO₂ addition and 7.5 days after SO₂ addition) and analyzed by Illumina MiSeq.

Before SO₂ addition, 21 yeast genera were identified and the genus *Hanseniaspora* was the most dominant by more than 90% of the total abundance (Figure 1A). The dominance of this genus was described previously on grapes and in must [47,48]. Other genera of enological interest like *Candida*, *Metschnikowia* and *Pichia* were also detected and are usually isolated on grapes and in fresh must [48]. Nevertheless, the genus *Saccharomyces* was not detected before SO₂ addition probably due to the low occurrence of this genus on grape berries [49,50].

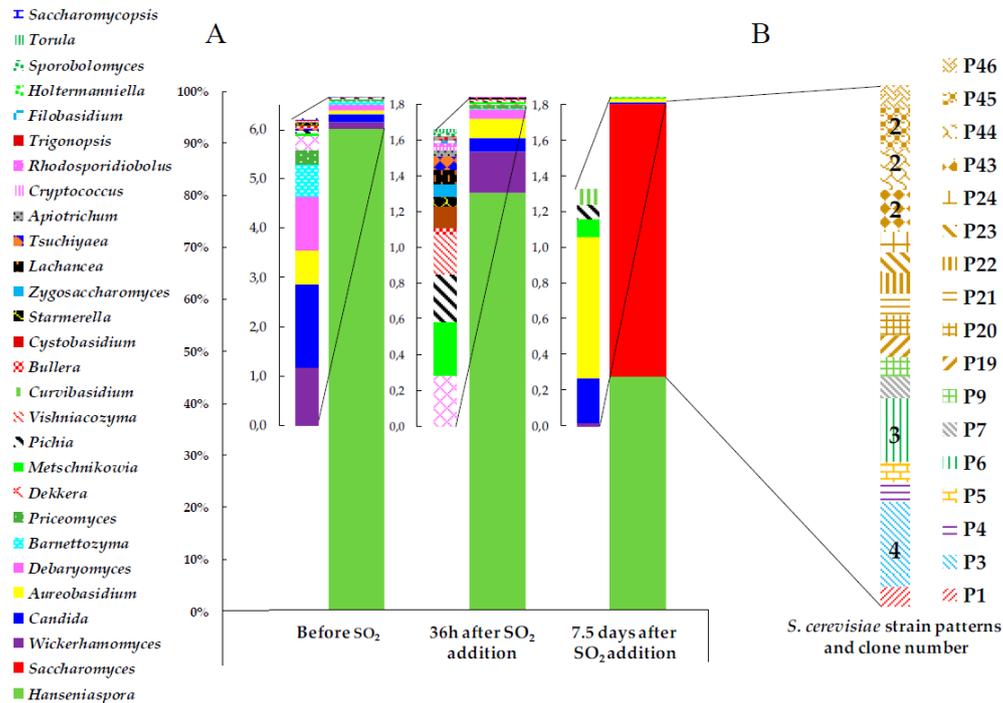


Figure 1. (A) Relative abundance of fungal genera identified in ‘Pied de Cuve’ for vintage 2016. (B) Number of isolates for *S. cerevisiae* strains in ‘Pied de Cuve’ at 7.5 days after SO₂ addition. Only the number of isolates per strain ≥ 2 is noted.

At 36 h after SO₂ addition, 24 yeast genera were identified and a slight decrease in the abundance of the genus *Hanseniaspora* was observed. The genera *Apiotrichum*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Holtermanniella*, *Lachancea*, *Rhodospordiobolus*, *Sporobolomyces*, *Torula*, *Trigonopsis* and *Tsuchiyaea* were newly detected. As well, an increase in the abundance of the genera *Aureobasidium*, *Candida* and *Wickerhamomyces* already detected before SO₂ addition was observed. Tolerance to high concentration of sulfur dioxide was previously demonstrated for the genera *Candida* and *Wickerhamomyces* [51,52]. Despite its better resistance to sulfur dioxide [53], the genus *Saccharomyces* was still not detected, as previously observed by Moschetti et al. [16].

At 7.5 days after SO₂ addition, eight yeast genera were identified. Among them, the genus *Saccharomyces* was detected at 53% of the total abundance due to the beginning of the AF. The majority of the non-*Saccharomyces* genera previously found were no longer detected at 7.5 days after SO₂ addition, except for the genera *Hanseniaspora* (45%) and the genera *Aureobasidium*, *Candida*, *Curvibasidium*, *Pichia*, *Metschnikowia* and *Wickerhamomyces* that were also detected but with a low abundance (1.5%).

At 7.5 days after SO₂ addition, start of the AF, yeast isolation on YPD agar medium was realized and a total of 25 isolates belonging to the species *S. cerevisiae* were identified by PCR-ITS. Among these 25 isolates, 17 different strain patterns were identified by interdelta PCR typing, highlighting a great intraspecific diversity (Figure 1B). Few studies described the diversity of wild *S. cerevisiae* strains in PDC. In this study, the diversity obtained is, as expected, higher than for a PDC made with commercial yeast [15] or for fortified PDC [16]. On the other hand, it corresponds to what is found in alcoholic fermentations made in native flora where the number of patterns is high [47,54,55].

3.3. Presence of Indigenous *S. cerevisiae* Detected in the PDC 2016 in the New Winery during 2016, 2017 and 2018

In order to study the presence of *S. cerevisiae* strains originated from the PDC 2016 in the new winery, samples were collected from WREs (2016, 2017 and 2018) and from different vats throughout the spontaneous fermentations during the first two vintages (2016 and 2017).

The two strains (P1 and P3) found in the PDC were also isolated in the must of the vat A and in the two uninoculated vats B and C (Figure 2A). The strain P4 found in the PDC was also isolated in the must of the vat A. We can say that these are strains associated with a given grape variety (Pinot noir) in a specific geographical location. At the end of AF 2016, the strain P1 is found in the wine of all vats (A, B and C) with a higher number of isolates. The strain P4 is found only in the wine of the vat A, the strain P3 in the wine of the vat B, and the strain P9 only in the wine of the vat C. Presence of the strain P9 in the wine of the vat C but not in the must is probably due to a transfer from PDC by winery equipment (pumps, and transfer pipes) or by the air of the winery [56] (Figure 2A).

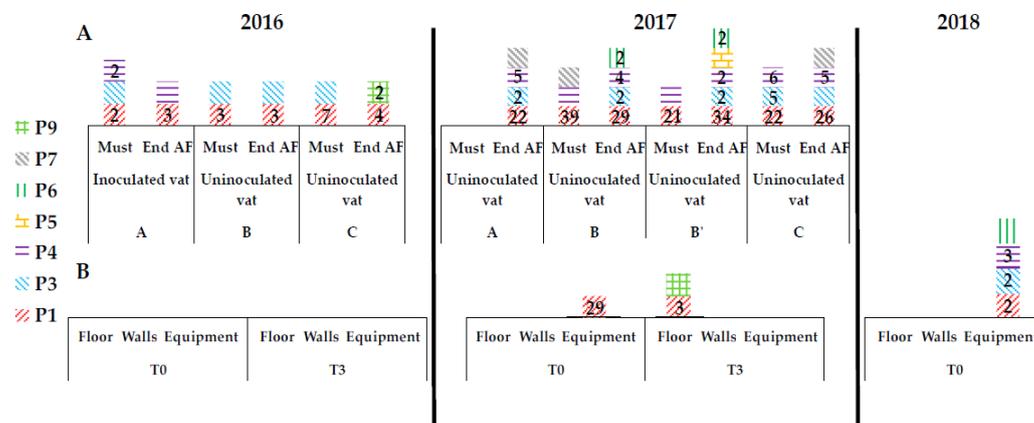


Figure 2. Persistence of strains of *S. cerevisiae* originated from Pied de Cuve (PDC) in the new winery studied during the three vintages: (A) In followed vats during the fermentations and (B) on WREs. Only the number of isolates per strain ≥ 2 is noted.

However, three months after the AF (T3), no *Saccharomyces cerevisiae* strains from the PDC were detected on the WREs: walls, floor and equipment (Figure 2B). Thus, the environment appears very unfavorable to this yeast species and the yeast population is very low since we have not detected any yeast with the methodology used.

Before the arrival of the next harvest (T0 2017), strain P1 was detected on winery equipment with a high number of isolates (29) (Figure 2B). Then, this strain was detected with a large number of isolates in must for the vats B, B' and C (Figure 2A). Either this strain is transferred by the equipment into the vats B, B' and C, or it is a recurring strain of the vineyard since this strain had already been found in all grape musts in 2016. The strains P3 and P4, found in musts in 2016 are again found in musts in 2017 (P3 in vat C and P4 in vats B, B' and C). They also appear to be vineyard strains. No strain from PDC was detected in must vat A for the vintage 2017.

At the end of alcoholic fermentation, the strains P1, P3 and P4 were found in the wines from all vats (A, B, B' and C). If no PDC strain has been detected in must vat A, P1, P3 and P4 strains have been detected after AF, probably due to by an air transfer of the strains from fermentation vats (B, B' and C) during alcoholic fermentations [45,57].

This strain P1, found at T0 in 2017 in equipment, is also found after the alcoholic fermentation on the floor in 2017 and in the winery equipment at T0 (before arrival of harvest) in 2018. Even if strain P1 was not detected on WREs after AF 2016, this strain could have started to colonize the winery between 2016 and 2018 vintages. The strains P3 and P4, involved in the alcoholic fermentation of 2016 and 2017,

are also detected in the winery equipment at T0 in 2018. So, strains of *S. cerevisiae* are able to colonize the WREs of a new winery.

3.4. Implication of Spontaneous Fermentations on *S. cerevisiae* Population Found on WREs

A total of 36 different strains were detected during the fermentations of the 2016 and 2017 vintages. Only the strain AF2, detected during 2016 vintage (must of vat A and in wine of vat B) was found for the vintage 2017 in musts of vats A, B et C and in wines of vats A, B, B' and C. This strain represented 2% of the total isolates in 2016 and then 17% in 2017 (Figure 3A). However, it is difficult to conclude to a transfer of this strain because this strain was not detected on WREs between the vintages 2016 and 2017. AF2 was again detected on WREs (equipment) in 2018 (Figure 3B). It could be an early colonization of the environment.

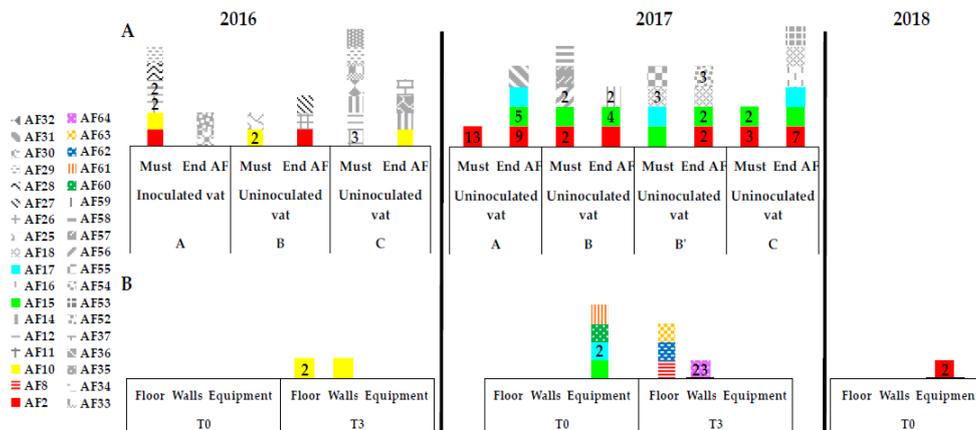


Figure 3. *S. cerevisiae* strains identified (A) in followed vats during the fermentation and (B) on winery surfaces during the three vintages. Only the number of isolates per strain ≥ 2 is noted.

As previously described in literature [58,59], some strains seem specific to a vintage: for example, the strain AF10 was detected in all vats of the 2016 vintage and after AF on floor and walls (T3 2016), and the strains AF15 and AF17 were specific to 2017 vintage (Figure 3B). The presence of the strains AF15 and AF17 on winery equipment at T0 2017, prior to the fermentation, is probably due to must handling before the sampling of the winery equipment. Three months after the end of fermentation 2017, four other strains (AF8, AF62, AF63 and AF64) were found on winery floor and walls, but were never detected during the fermentations of both years (Figure 3B). Their presence on WREs seems temporary because they were not detected in 2018.

Thus, the colonization of strains from spontaneous fermentations on WREs, which has never been reported before, is only slightly demonstrated in this work. Apparently only a very small number of strains appear able to be maintained in the environment of the winery between two vintages. It is also noteworthy to mention that, even by Illumina MiSeq, the detection of the genus *Saccharomyces* was between 0.1 and 1% on WREs (data not shown). So, to better highlight the transfer of strains, the number of isolates should be considerably increased (not 50 isolates per sample but 500 or 1000).

3.5. Capacity to form Biofilms on Stainless Steel

To evaluate the ability of some strains to persist on WREs, eight strains were selected to study their capacity to form biofilms. The strains P1 and P4 found in particular in the PDC were selected according to their potential capacity to persist on WREs (for 2017 at T0 and T3 and for 2018 at T0). Strains AF8, AF28, AF63, AF64 and P19 isolated only one time in this study (on WREs at T3 2017 for AF8, AF63, AF64, in must 2016 for AF28 or in PDC 2016 for P19, respectively) were also selected. Strain AF10 was also selected because this strain was isolated only during vintage 2016 in must, wine and on

WREs at T3. These six strains can be qualified as strains with low colonization capacity. In addition, one commercial strain (Lalvin Rhône 2056) was selected as reference strain whose biofilm capacity was previously described [32,43]. In total, nine strains were studied for their capacity to form biofilms on stainless steel.

Firstly, to confirm the capacity of the strains studied to form biofilms on stainless steel, SEM observations were realized on 48 h aged biofilms for two strains P1 and P19 (Figure 4). Microcolonies contained cells embedded in EPS matrix (exopolymeric substances) were observed for both strains and coherent with structures described for others species like *Candida albicans*, *Hanseniopsis uvarum* and *Rhodotorula mucilaginosa* [60–62]. Some differences were observed between both strains: the surface coverage for the strain P19 was more scattered and the microcolonies structures were less developed compared to the strain P1 (Figure 4).

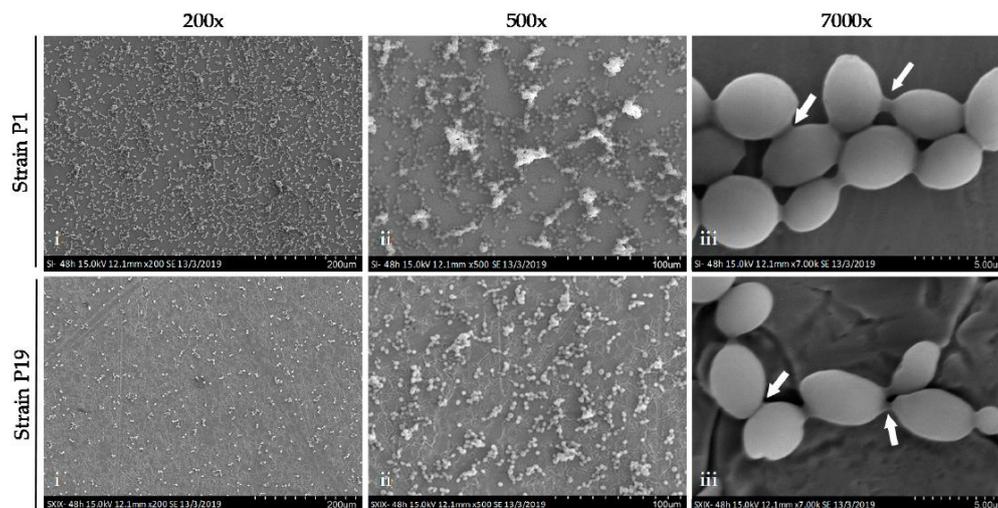


Figure 4. SEM observations of 48h-aged microcolonies for the strains P1 and P19 developed on stainless steel chips in YPD medium. (i) At 200x: adhered cells; (ii) at 500x: microcolonies and (iii) 7000x: microcolonies with exopolymeric substances (EPS—indicated by white arrows).

Secondly, adhesion (2 h) and biofilm growth (48 h) were monitored for the nine selected strains on stainless steel chips (Figure 5). All strains were able to adhere on stainless steel after 2 h (average 4.2×10^4 CFU/cm²) and no significant difference was observed between strains (data not shown). But after 48 h, different growth of microcolonies was observed (Figure 5). For strains P1 and P4 selected for their potential capacity to colonize WREs, a growth was observed after 48 h, particularly for the strain P1 (+1 Log CFU/cm²). Conversely, for strains AF10, AF63, AF64, AF28 and P19 selected for their low colonization capacity, no growth was observed after 48 h. Moreover, the strain AF63 declined significantly. Only the strain AF8 showed significant growth after 48 h (+1 Log CFU/cm²). Therefore, most strains isolated punctually or without potential persistence during two vintages in the new winery do not show microcolony growth on stainless steel. Using SEM observations, we validate the differences of strain behaviors. In fact, strain P19 characterized by a low potential persistence forms less microcolonies at 48 h than strain P1 described with a potential capacity for colonization (Figure 4).

Based on the different results obtained in this study we can suppose that the ability to form biofilms may be a factor favoring strain colonization or persistence. Kuthan et al. [63] have suggested that biofilms, surface adhesion and filamentous/invasive growth may confer, for wild *S. cerevisiae* strains, the ability to invade and thrive in unfavorable nutrient environments compared to domestic strains (laboratory strains) which lose this capacity because yeasts are grown routinely in rich media.

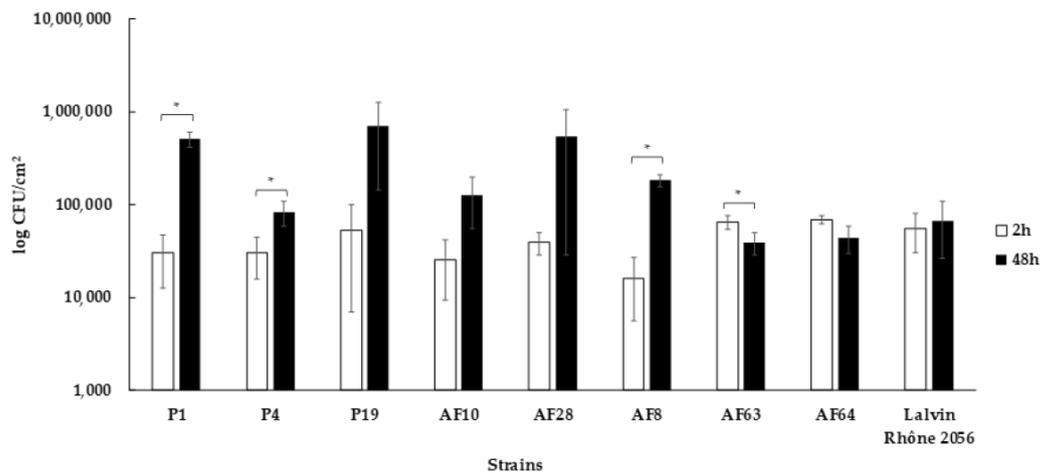


Figure 5. Microcolony growth on stainless steel chips in YPD medium for the selected strains (log CFU/cm²). Errors bars represent the standard deviation between three independent biological replicates. Statistical analysis is performed between the two time points for each strain (ANOVA, p -value ≤ 0.05).

4. Conclusions

This study aimed to shed new light on the role of yeast flora found on wine related environments, and its involvement during winemaking. Therefore, this work provides first insights about the colonization of wild *S. cerevisiae* in a new winery operating only with indigenous flora. The isolation and identification of *S. cerevisiae* strains have been carried out in ‘Pied de Cuve’ (PDC), realized the first year, and during the spontaneous alcoholic fermentation in different vats. In total, 53 different strains were identified for the two consecutive vintages. Then, the search for these different strains has been carried out in wine-related environments like floor, walls and equipment (WREs) for the same vintages. Yeasts of the *Saccharomyces cerevisiae* species were scarcely detected in the WREs. Only some strains have been found in the WREs, thus showing a beginning of colonization of this environment. Among these, the P1 strain was found in 2016, 2017 and 2018 in grape musts and wines and in the WREs in 2017 and 2018 with a high number of isolates. This strain appeared both well adapted to the environment must and wine but also able to remain in the winery over time.

The ability to form a biofilm on stainless steel chips was studied for eight strains of *Saccharomyces cerevisiae* (colonizing strains and strains with a low colonization). Differences in biofilm structure and growth ability on stainless steel were observed between the studied strains and could partly explain the colonization observed for certain strains and in particular strain P1. This ability to colonize the environment could be strain-dependent like ethanol resistance and sulfite tolerance [64,65]. However, to support this hypothesis, further investigations will be needed. Moreover, the adhesion capacity should be studied for the different strains because it could also partly explain the colonization of the environments.

Author Contributions: Conceptualization S.R., M.G.-B., H.A. (Hany Abdo); data curation H.A. (Hany Abdo); formal analysis H.A. (Hany Abdo), C.R.C., M.V., P.D., F.M.C., J.L., V.D.-V.; investigation S.R., M.G.-B., H.A. (Hany Abdo); methodology C.R.C., M.V., P.D., F.M.C.; resources C.R.C., M.V., P.D., F.M.C.; software C.R.C., M.V., P.D., F.M.C.; supervision S.R., M.G.-B., H.A. (Hervé Alexandre), M.V.; validation S.R., M.G.-B., H.A. (Hervé Alexandre); visualization S.R., M.G.-B., H.A. (Hervé Alexandre); writing—original draft. S.R., M.G.-B., H.A. (Hany Abdo); writing—review and editing M.G.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Regional Council of Bourgogne- Franche-Comté, the “Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)” grant number [CRB 2016-9201AAO048S01632] and the “Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB)” grant number [CONV1617_04].

Acknowledgments: The authors would like to thank the wine company who provided the facility in which this study was realized, Baptiste Pierre and Laurine Laroche for his technical help with the experiments and Marie-Laure Léonard and Jean-Marc Dachicourt (ESIREM, Université de Bourgogne, Dijon, France) for their technical assistance for the microscopic observations.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Kraus, J.K.; Reed, G.; Villettaz, J.-C. Levures sèches actives de vinification. 1^{ère} partie: Fabrication et caractéristiques. *OENO One* **1983**, *17*, 93–103. [[CrossRef](#)]
2. Reed, G.; Nagodawithana, T.W. Technology of yeast usage in winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.* **1988**, *39*, 83–90.
3. Schuller, D.; Casal, M. The genetic structure of fermentative vineyard-associated *Saccharomyces cerevisiae* populations revealed by microsatellite analysis. *Antonie Leeuwenhoek* **2007**, *91*, 137–150. [[CrossRef](#)]
4. Belda, I.; Ruiz, J.; Esteban-Fernández, A.; Navascués, E.; Marquina, D.; Santos, A.; Moreno-Arribas, V. Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement. *Molecules* **2017**, *22*, 189. [[CrossRef](#)]
5. Berbegal, C.; Spano, G.; Fragasso, M.; Grieco, F.; Russo, P.; Capozzi, V. Starter cultures as biocontrol strategy to prevent *Brettanomyces bruxellensis* proliferation in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 569–576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Fleet, G.H. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *86*, 11–22. [[CrossRef](#)]
7. Fleet, G.H. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* **2008**, *8*, 979–995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Jolly, N.P.; Varela, C.; Pretorius, I.S. Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* **2014**, *14*, 215–237. [[CrossRef](#)]
9. Lu, Y.; Huang, D.; Lee, P.-R.; Liu, S.-Q. Assessment of volatile and non-volatile compounds in durian wines fermented with four commercial non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 1511–1521. [[CrossRef](#)]
10. Petrucci, L.; Capozzi, V.; Berbegal, C.; Corbo, M.R.; Bevilacqua, A.; Spano, G.; Sinigaglia, M. Microbial resources and enological significance: Opportunities and benefits. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 995. [[CrossRef](#)]
11. Medina, K.; Boido, E.; Dellacassa, E.; Carrau, F. Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *157*, 245–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Jackson, R.S. Nature and origin of wine quality. In *Wine Tasting: A Professional Handbook*, 2nd ed.; Jackson, R.S., Ed.; Academic Press: Burlington, MA, USA, 2009; pp. 387–426.
13. Ubeda Iranzo, J.F.; González Magaña, E.; González Viñas, M.A. Evaluation of the formation of volatiles and sensory characteristics in the industrial production of white wines using different commercial strains of the genus *Saccharomyces*. *Food Control* **2000**, *11*, 143–147. [[CrossRef](#)]
14. Clavijo, A.; Calderón, I.L.; Paneque, P. Yeast assessment during alcoholic fermentation inoculated with a natural “*ped de cuve*” or a commercial yeast strain. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *27*, 1569–1577. [[CrossRef](#)]
15. Li, E.; Liu, C.; Liu, Y. Evaluation of yeast diversity during wine fermentations with direct inoculation and *ped de cuve* method at an industrial scale. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *22*, 960–966. [[CrossRef](#)]
16. Moschetti, G.; Corona, O.; Gaglio, R.; Squadrito, M.; Parrinello, A.; Settanni, L.; Barone, E.; Francesca, N. Use of fortified *ped de cuve* as an innovative method to start spontaneous alcoholic fermentation for red winemaking. *J. Grape Wine Res.* **2016**, *22*, 36–45. [[CrossRef](#)]
17. Tello, J.; Cordero-Bueso, G.; Aporta, I.; Cabellos, J.M.; Arroyo, T. Genetic diversity in commercial wineries: Effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *112*, 302–315. [[CrossRef](#)]
18. Martiniuk, J.T.; Pacheco, B.; Russell, G.; Tong, S.; Backstrom, I.; Measday, V. Impact of commercial strain use on *Saccharomyces cerevisiae* population structure and dynamics in Pinot Noir vineyards and spontaneous fermentations of a Canadian winery. *PLoS ONE* **2016**, *11*. [[CrossRef](#)]
19. Santamaria, P.; Garijo, P.; López, R.; Tenorio, C.; Gutiérrez, A.R. Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: Effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *103*, 49–56. [[CrossRef](#)]

20. Mercado, L.; Dalcero, A.; Masuelli, R.; Combina, M. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiol.* **2007**, *24*, 403–412. [[CrossRef](#)]
21. Santamaría, P.; López, R.; López, E.; Garijo, P.; Gutierrez, A.R. Permanence of yeast inocula in the winery ecosystem and presence in spontaneous fermentations. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 1563–1567. [[CrossRef](#)]
22. Grangeteau, C. Biodiversité Fongique du Raisin au Vin: Impact de l'activité anthropique. Ph.D. Thesis, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France, 2016.
23. Constantí, M.; Poblet, M.; Arola, L.; Mas, A.; Guillamón, J.M. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am. J. Enol. Vitic.* **1997**, *48*, 339–344.
24. Beltran, G.; Torija, M.J.; Novo, M.; Ferrer, N.; Poblet, M.; Guillamón, J.M.; Rozès, N.; Mas, A. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* **2002**, *25*, 287–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Clavijo, A.; Calderón, I.L.; Paneque, P. Effect of the use of commercial *Saccharomyces* strains in a newly established winery in Ronda (Málaga, Spain). *Antonie Leeuwenhoek* **2011**, *99*, 727–731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Starmer, W.T.; Ganter, P.F.; Aberdeen, V.; Lachance, M.; Phaff, H.J. The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Can. J. Microbiol.* **1987**, *33*, 783–796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. De Ullivarri, M.F.; Mendoza, L.M.; Raya, R.R. Killer activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains: Partial characterization and strategies to improve the biocontrol efficacy in winemaking. *Antonie Leeuwenhoek* **2014**, *106*, 865–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Salma, M.; Rousseaux, S.; Sequeira-Le Grand, A.; Divol, B.; Alexandre, H. Characterization of the viable but nonculturable (VBNC) state in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* **2013**, *8*. [[CrossRef](#)]
29. Davey, M.E.; O'Toole, G.A. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, *64*, 847–867. [[CrossRef](#)]
30. O'Connell, H.A.; Kottkamp, G.S.; Eppelbaum, J.L.; Stubblefield, B.A.; Gilbert, S.E.; Gilbert, E.S. Influences of biofilm structure and antibiotic resistance mechanisms on indirect pathogenicity in a model polymicrobial biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 5013–5019. [[CrossRef](#)]
31. Bastard, A.; Coelho, C.; Briandet, R.; Canette, A.; Gougeon, R.; Alexandre, H.; Guzzo, J.; Weidmann, S. Effect of biofilm formation by *Oenococcus oeni* on malolactic fermentation and the release of aromatic compounds in wine. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 613. [[CrossRef](#)]
32. Tek, E.L.; Sundstrom, J.F.; Gardner, J.M.; Oliver, S.G.; Jiranek, V. 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.* **2018**, *94*. [[CrossRef](#)]
33. Taylor, D.L.; Walters, W.A.; Lennon, N.J.; Bochicchio, J.; Krohn, A.; Caporaso, G.J.; Pennanen, T. Accurate estimation of fungal diversity and abundance through improved lineage-specific primers optimized for Illumina Amplicon Sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 7217–7226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gweon, H.S.; Oliver, A.; Taylor, J.; Booth, T.; Gibbs, M.; Read, D.S.; Griffiths, R.I.; Schonrogge, K. PIPITS: An automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. *Methods Ecol. Evol.* **2015**, *6*, 973–980. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Rognes, T.; Flouri, T.; Nichols, B.; Quince, C.; Mahé, F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **2016**, *4*, E2584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Wang, Q.; Garrity, G.M.; Tiedje, J.M.; Cole, J.R. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 5261–5267. [[CrossRef](#)]
37. Kõljalg, U.; Larsson, K.H.; Abarenkov, K.; Nilsson, R.H.; Alexander, I.J.; Eberhardt, U.; Erland, S.; Høiland, K.; Kjoller, R.; Larsson, E.; et al. UNITE: A database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* **2005**, *166*, 1063–1068. [[CrossRef](#)]
38. Grangeteau, C.; Gerhards, D.; von Wallbrunn, C.; Alexandre, H.; Rousseaux, S.; Guilloux-Bénatier, M. Persistence of two non-*Saccharomyces* yeasts (*Hanseniaspora* and *Starmellera*) in the cellar. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 268. [[CrossRef](#)]
39. Werner, O.; Ros, R.M.; Guerra, J. Direct amplification and NaOH extraction: Two rapid and simple methods for preparing bryophyte DNA for polymerase chain reaction (PCR). *J. Bryol.* **2002**, *24*, 127–131. [[CrossRef](#)]

40. White, T.J.; Bruns, T.D.; Lee, S.B.; Taylor, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*; Innis, M.A., Ed.; Academic Press: New York, NY, USA, 1990; pp. 315–322.
41. Esteve-Zarzoso, B.; Belloch, C.; Uruburu, F.; Querol, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1999**, *49*, 329–337. [[CrossRef](#)]
42. Legras, J.-L.; Karst, F. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *221*, 249–255. [[CrossRef](#)]
43. Rodriguez, M.E.; Orozco, H.; Cantoral, J.M.; Matallana, E.; Aranda, A. Acetyltransferase SAS2 and sirtuin SIR2, respectively, control flocculation and biofilm formation in wine yeast. *FEMS Yeast Res.* **2014**, *14*, 845–857. [[CrossRef](#)]
44. Ocón, E.; Gutiérrez, A.R.; Garijo, P.; López, R.; Santamaría, P. Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. *Food Microbiol.* **2010**, *27*, 1023–1027. [[CrossRef](#)]
45. Ocón, E.; Garijo, P.; Sanz, S.; Olarte, C.; Santamaría, P.; Gutiérrez, A.R. Analysis of airborne yeast in one winery over a period of one year. *Food Control* **2013**, *30*, 585–589. [[CrossRef](#)]
46. Abdo, H.; Catacchio, C.R.; Ventura, M.; D'Addabbo, P.; Alexandre, H.; Guilloux-Bénatier, M.; Rousseaux, S. The fungal life of a new winery: Establishment of the fungal consortium. *Sci. Rep.* **2019**. (Under Review).
47. Sabate, J.; Cano, J.; Esteve-Zarzoso, B.; Guillamon, J.M. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol. Res.* **2002**, *157*, 267–274. [[CrossRef](#)]
48. Barata, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *153*, 243–259. [[CrossRef](#)]
49. Mortimer, R.; Polsinelli, M. On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* **1999**, *150*, 199–204. [[CrossRef](#)]
50. Valero, E.; Cambon, B.; Schuller, D.; Casal, M.; Dequin, S. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Res.* **2007**, *7*, 317–329. [[CrossRef](#)]
51. Warth, A.D. Resistance of yeast species to benzoic and sorbic acids and to sulfur dioxide. *J. Food Prot.* **1985**, *48*, 564–569. [[CrossRef](#)]
52. Henick-Kling, T.; Edinger, W.; Daniel, P.; Monk, P. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *J. Appl. Microbiol.* **1998**, *84*, 865–876. [[CrossRef](#)]
53. Constantí, M.; Reguant, C.; Poblet, M.; Zamora, F.; Mas, A.; Guillamón, J.M. Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **1998**, *41*, 169–175. [[CrossRef](#)]
54. Vezinhet, F.; Hallet, J.; Valade, M.; Poulard, A. Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. *Am. J. Enol. Vitic.* **1992**, *43*, 83–86.
55. Le Jeune, C.; Erny, C.; Demuyter, C.; Lollier, M. Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiol.* **2006**, *23*, 709–716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Garijo, P.; Santamaría, P.; López, R.; Sanz, S.; Olarte, C.; Gutiérrez, A.R. The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *125*, 141–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Grangeteau, C.; Gerhards, D.; Rousseaux, S.; von Wallbrunn, C.; Alexandre, H.; Guilloux-Bénatier, M. Diversity of yeast strains of the genus *Hanseniaspora* in the winery environment: What is their involvement in grape must fermentation? *Food Microbiol.* **2015**, *50*, 70–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Torija, M.J.; Rozès, N.; Poblet, M.; Guillamón, J.M.; Mas, A. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie Leeuwenhoek* **2001**, *79*, 345–352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Schuller, D.; Alves, H.; Dequin, S.; Casal, M. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde region of Portugal. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2005**, *51*, 167–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Nunes, J.M.; Bizerra, F.C.; Ferreira, R.C.; Colombo, A.L. Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 382–389. [[CrossRef](#)]

61. Pu, L.; Jingfan, F.; Kai, C.; Chao-An, L.; Yunjiang, C. Phenylethanol promotes adhesion and biofilm formation of the antagonistic yeast *Kloeckera apiculata* for the control of blue mold on citrus. *FEMS Yeast Res.* **2014**, *14*, 536–546. [[CrossRef](#)]
62. Weerasekera, M.M.; Wijesinghe, G.K.; Jayarathna, T.A.; Gunasekara, C.P.; Fernando, N.; Kottegoda, N.; Samaranyake, L.P. Culture media profoundly affect *Candida albicans* and *Candida tropicalis* growth, adhesion and biofilm development. *Mem. Do Inst. Oswaldo Cruz* **2016**, *111*, 697–702. [[CrossRef](#)]
63. Kuthan, M.; Devaux, F.; Janderová, B.; Slaninová, I.; Jacq, C.; Palková, Z. Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Mol. Microbiol.* **2003**, *47*, 745–754. [[CrossRef](#)]
64. Arroyo-López, F.N.; Salvadó, Z.; Tronchoni, J.; Guillamon, J.M.; Barno, E.; Quérol, A. Susceptibility and resistance to ethanol in *Saccharomyces* strains isolated from wild and fermentative environments. *Yeast* **2010**, *27*, 1005–1015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Nadai, C.; Treu, L.; Campanaro, S.; Giacomini, A.; Corich, V. Different mechanisms of resistance modulate sulfite tolerance in wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 797–813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Chapitre 5 : Biodiversité microbienne dans l'environnement de caves d'élevage

A l'heure actuelle, très peu sont les travaux qui se sont intéressés à l'étude de la biodiversité et de l'évolution des populations microbiennes présentes dans les environnements reliés au vin et plus particulièrement dans l'environnement de caves d'élevage. La majorité des études existantes décrivent la biodiversité des populations microbiennes au moyen de méthodes conventionnelles d'identification (Peynaud et Domercq, 1959 ; Belin, 1979). En dehors de la biodiversité microbienne, d'autres études se sont particulièrement intéressées à l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* dont la présence dans les caves d'élevage s'est avérée récurrente. Les fûts utilisés au cours de l'élevage constituent une niche écologique importante pour cette espèce (Laureano *et al.*, 2005 ; Barata *et al.*, 2013 ; González-Arenzana *et al.*, 2013). Cependant, aucune étude, jusqu'à présent, ne s'est intéressé à la dynamique de la levure *B. bruxellensis* au cours de l'élevage.

En se basant sur ce contexte, le premier objectif de cette partie de thèse était d'étudier la biodiversité des flores microbiennes totales dans l'environnement de trois caves d'élevage par séquençage haut débit Illumina Mi-Seq. Le deuxième objectif de ce travail était d'étudier la dynamique de la levure *B. bruxellensis* au cours de l'élevage et d'établir des corrélations potentielles avec la biodiversité fongique totale et les pratiques œnologiques des trois caves. Est-ce que des modifications de la flore de cave peuvent avoir lieu selon l'itinéraire technique associé, et est-ce que ces modifications impactent les équilibres microbiens et donc la présence de *B. bruxellensis* ?

Etude de la flore microbienne et de la dynamique de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* dans l'environnement de trois caves d'élevage

Abdo, Hany¹, Catacchio, Claudia Rita², Ventura, Mario², D'Addabbo, Pietro², Lebleux, Manon¹, Alexandre, Hervé¹, Guilloux-Bénatier, Michèle¹ and Rousseaux, Sandrine^{1*}

¹ Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France- IUVV Equipe VALMiS, rue Claude Ladrey, BP 27877, 21078 Dijon Cedex, France

² Department of Biology, University of Bari, Bari 70125, Italy

* Auteur correspondant: sandrine.rousseau@u-bourgogne.fr

Adresse : Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, rue Claude Ladrey, BP 27877, 21078
Dijon Cedex, France

1. Introduction

Après la fermentation alcoolique, l'élaboration des vins nécessite une étape d'élevage, durant laquelle le vin repose pendant plusieurs mois et subit une évolution structurale et aromatique (Jackson, 1994). En fonction des régions et du vin élaboré, cette étape peut être réalisée dans différents contenants, tels que les fûts de chêne et dans ce cas, cette étape se réalise dans une cave d'élevage. Si la biodiversité microbienne des cuveries a été très étudiée (Belin, 1979 ; Ocón *et al.*, 2010,2013 ; Pérez-Martín *et al.*, 2014), peu de travaux se sont focalisés sur l'étude de la biodiversité des flores microbiennes présentes dans des caves d'élevage et plus spécifiquement sur les WREs (Wine Related Environments) tels que le sol, les murs, l'air, le matériel vinaire et les fûts. En effet, les données disponibles à l'heure actuelle sur la biodiversité levurienne des WREs de caves reposent, essentiellement, sur les résultats décrits par deux études anciennes utilisant des méthodes conventionnelles d'identification basées sur la morphologie des colonies développées sur un milieu gélosé (Peynaud et Domercq, 1959 ; Belin, 1979). Ces travaux ont permis de mettre en évidence la présence de plusieurs genres levuriens (*Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* et *Trichosporon*) isolés sur les différents WREs. Plus récemment,

toujours en utilisant les mêmes méthodes conventionnelles d'identification, Simeray *et al.* (2000), Picco et Rodolfi (2004) et Ocón *et al.* (2011) ont mis en évidence, dans l'air de caves d'élevage, la présence de deux genres levuriens non décrits dans les précédentes études (*Aureobasidium* et *Sporobolomyces*) et de trente-trois genres de moisissures et champignons (dont les genres majoritaires : *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Penicillium* et *Trichoderma*). A notre connaissance, une seule étude décrit la biodiversité de la flore de cave en utilisant une méthode culture indépendante (séquençage nouvelle génération (NGS : Next Generation Sequencing) (Bokulich *et al.*, 2013). En plus des genres levuriens précédemment décrits par les méthodes conventionnelles, les auteurs ont décrit la présence de plusieurs genres de moisissures (*Alternaria*, *Aspergillus* et *Wallemia*) et de bactéries (*Brevundimonas*, *Methylobacterium*, *Oenococcus*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Shewanella* et *Sphingomonas*) au niveau du sol et des fûts. Néanmoins, cette étude a été réalisée dans une cave expérimentale et la biodiversité microbienne a été décrite uniquement sur deux environnements de la cave (sol et fûts).

Outre la description des populations présentes, certaines des études citées précédemment ont décrit l'impact de facteurs influençant la biodiversité des populations microbiennes et l'implantation potentielle de ces populations dans l'environnement de la cave. Ainsi, Simeray et ses collaborateurs (2001) ont suggéré que la flore résidante dans l'air de caves est impactée par l'itinéraire de vinification adopté. En effet, une population élevée de moisissures et champignons a été observée dans l'air des caves où les fermentations sont conduites sans utilisation de SO₂ (2 547 UFC/m³ d'air) par rapport à des caves où les fermentations sont conduites avec du SO₂ (moyenne : 771 UFC/m³ d'air). Quant aux travaux de Guzzon *et al.* (2011), ils mettent en évidence que l'application de techniques de nettoyage et de désinfection (vapeur humide, traitement aux lumières UV et ozone) induit des modifications de la biodiversité des populations levuriennes présentes au niveau des fûts. Ainsi, une forte diminution de l'abondance des genres *Candida* et *Debaryomyces* est observée à la surface interne des fûts après désinfection. Mais l'efficacité des techniques de nettoyage et de désinfection utilisées envers la levure d'altération *Brettanomyces bruxellensis* semble être limitée (Yap *et al.*, 2007 ; Schmid *et al.*, 2011 ; Guzzon *et al.*, 2017 ; Edwards et Cartwright, 2019). Après nettoyage et désinfection, cette levure a été détectée à plusieurs reprises au niveau de la couche interne des fûts, des lies et autour du trou de bonde (Laureano *et al.*, 2005 ; Barata *et al.*, 2013 ; González-Arenzana *et al.*, 2013). L'inefficacité de certaines techniques utilisées pour éliminer la levure *B. bruxellensis* semble être en lien avec les propriétés physico-chimiques

du bois (porosité, inertie thermique) (Stanga, 2010) mais également avec le fait que *B. bruxellensis* peut se retrouver à des profondeurs de 6 à 8 mm dans le bois (Suárez *et al.*, 2007 ; Barata *et al.*, 2013). Malgré toutes ces connaissances, les raisons de la récurrence de *B. bruxellensis* dans l'environnement d'une cave d'élevage sont encore peu connues.

Ainsi, les objectifs de ce travail ont été : (i) l'étude de la biodiversité microbienne dans l'environnement (sol, murs, matériel, fûts, vins) de trois caves d'élevage différentes et pendant deux millésimes (2016 et 2017) par la technique Illumina Mi-Seq et en parallèle par une méthode culture dépendante et (ii) l'étude de la dynamique de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* au cours de l'élevage.

2. Matériels et méthodes

2.1 Echantillonnage

Trois caves (nommées B, PR et M), réparties sur le vignoble de la Côte d'Or, ont été sélectionnées. Pour les 2 millésimes étudiés, 2016 et 2017, des prélèvements ont été effectués, au cours de la période d'entonnage et en début d'élevage (avant entonnage, fin entonnage, 2, 4 et 8 mois après la fin de l'entonnage), au niveau du sol, des murs, du matériel (robinets, tuyaux, pipettes, seaux, cuves de transfert, ...) et sur l'extérieur des fûts.

Pour le millésime 2016 et pour chaque environnement et temps, 20 prélèvements ont été réalisés à l'aide d'écouvillons stériles soit au total 1 200 prélèvements pour les 3 caves.

Pour le millésime 2017, le nombre de fûts entonnés a été plus important. En effet, le millésime 2017 a été un millésime normal en volume comparé au millésime 2016, millésime marqué par un gel de printemps en avril 2016. Ainsi, les prélèvements sur l'extérieur des fûts ont été doublés en 2017 (40 prélèvements) et au total 1 500 prélèvements ont été réalisés pour le millésime 2017 au niveau des 3 caves. Ces différents prélèvements ont été poolés : 20 ou 40 écouvillons d'un même environnement et temps dans un volume de 20 ou 40 mL d'eau physiologique (NaCl à 0,9% w/v). Au total, 20 échantillons moyens ont été obtenus par millésime et par cave.

2.2 Séquençage Illumina

2.2.1 Extraction d'ADN

A partir des échantillons moyens provenant des environnements des 3 caves, 10 mL ont été centrifugés à 4000 rpm pendant 4 min à 4 °C. Après élimination du surnageant, le culot a été mis en suspension dans 200 µL de tampon d'extraction DNA Yeast (Triton X-100 à 2% (v/v),

SDS à 1% (w/v), NaCl à 100 mM, Tris à 10 mM et EDTA à 1 mM pH 8). A cette suspension, 60 µL de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25: 24: 1) et 0,3 g de billes en verre (0,5 mm de diamètre) ont été ajoutés. Les cellules ont été lysées en utilisant le disrupteur 'Precellys 24-Dual' (Bertin Technologies) pendant 3 x 45s et placées 2 min dans la glace. Ensuite, 200 µL de tampon TE ont été ajoutés (Tris à 10 mM et EDTA à 1 mM pH 8) et le mélange a été centrifugé à 13 700 rpm pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant a été repris et l'ADN a été précipité dans 1 mL d'une solution d'éthanol à 100% (v/v) et centrifugé à 13 700 rpm pendant 10 min à 20 °C. Le culot d'ADN a été lavé avec une solution d'éthanol à 70% (v/v) puis centrifugé à 13 700 rpm pendant 5 min à 20 °C. Enfin, l'ADN a été séché à 95 °C pendant 5 min afin d'éliminer l'excès d'éthanol et finalement remis en suspension dans 40 µL d'eau Milli-Q et stocké à -20 °C pour l'analyse métagénomique.

2.2.2 Amplification de la région ITS et séquençage Illumina Mi-Seq

La région ITS 2 (Internal Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomique a été amplifiée pour l'analyse métagénomique, en utilisant une approche mono-index. Les amorces 'Phusion' utilisées pour cette étude étaient 5,8 S-Fun (5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATNNNNNNNNNN-AGTCAGTCAG-GG-AACTTTYRRCAYGGATCWCT-3') et ITS4-Fun (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-TATGGTAATT-AA-AGCCTCCGCTTATTGATATGCTTAART-3'). Les amorces utilisées contiennent (de gauche à droite) l'adaptateur de séquençage Illumina de 24 à 29 pb, le code barre d'identification 'Golay' (uniquement pour l'amorce 5,8 S-Fun) de 12 pb, un 'primer pad' de 10 pb, un lieur de 2 pb et la séquence codante pour le fragment ITS de 21 à 27 pb (Taylor *et al.*, 2016). L'amplification par PCR a été réalisée dans un volume final de 50 µL, comprenant 2 µL d'ADN, 0,3 µL de Platinum Taq DNA polymérase 2,5U (Invitrogen™, Waltham, MA, USA), 1 × Tampon Taq, 20 µM dNTP et 1 µL de chaque amorce à 10 µM. Le programme PCR consisté à une étape de dénaturation pour 5 min à 94 °C suivie par 30 cycles de 30s à 94 °C, 1 min à 60 °C, 1 min à 72 °C et une dernière étape d'extension à 72 °C pour 5 min. Ensuite, les produits de PCR ont été poolés et purifiés en utilisant le kit de purification QIAquick (Qiagen, Germantown, MD). La concentration a été déterminée utilisant le kit Qubit® dsDNA HS Assay kit (Thermo Fisher Scientifics, USA). Le séquençage a ensuite été réalisé avec un Illumina® Mi-Seq (2 × 300 cycles) (Illumina, San Diego, California, USA). 20 à 25 % d'ADN PhiX ont été inclus à l'analyse pour ajouter la diversité de base.

2.2.3 Analyse des séquences

Les données obtenues après le séquençage Mi-Seq ont été analysées en utilisant PIPITS, un pipeline automatisé pour la détection et la différenciation des séquences ITS (Gweon *et al.*, 2015) qui produit des tableaux d'abondance des unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) pour chaque échantillon.

2.3 Dénombrement des populations microbiennes cultivables

Pour chaque échantillon moyen obtenus, des étalements sur les milieux YPD (0,5% w/v extrait de levures, 1% p/v bacto-peptone, 2% p/v glucose, 2% w/v agar et 0,02% w/v chloramphénicol) et ITV (1% w/v extrait de levure, 2% w/v bacto-peptone, 2% w/v glucose, 0,01% w/v acide p-coumarique, 0,01% acide férulique, 0,003% vert de bromocresol, 0,006% cycloheximide, 0,02% w/v chloramphénicol et 2% w/v agar, pH = 5) ont été réalisés pour le dénombrement des levures totales et de la levure *Brettanomyces*, respectivement. De plus, un dénombrement des populations de bactéries lactiques et acétiques a été réalisé en utilisant les milieux Lac (3,3% w/v extrait de levure, 0,08% w/v MnSO₄ H₂O, 2% w/v agar, 0,06% v/v Tween 80, 1% w/v Delvolid® et 7,8% v/v de jus de raisin blanc, pH = 5,1) et GYC (1% w/v extrait de levure, 10% w/v glucose, 2% w/v carbonate de calcium CaCO₃ et 2% w/v agar), respectivement. Les étalements ont ensuite été incubés à 20 °C pour le milieu YPD, à 28 °C sous CO₂ pour le milieu Lac et à 28 °C pour le milieu ITV et le milieu GYC pendant 48-72 h ou plus selon les populations à dénombrer. Après incubation, les populations microbiennes ont été dénombrées par comptage des colonies développées et les résultats ont été exprimés en UFC/cm².

2.4 Isolement de levures

A partir des milieux YPD et ITV, 50 colonies (en moyenne) ont été sélectionnées puis purifiées sur milieu YPD gélosé. Après 48 h, les isolats ont été cultivés en milieu YPD liquide additionné de glycérol (25%, v/v) et conservés à -80 °C avant identification.

2.5 Identification moléculaire des isolats de levures

2.5.1 PCR ITS

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir de colonies fraîches selon le protocole de Werner *et al.*, (2002). Brièvement, les isolats ont été remis en culture, puis une colonie a été prélevée et mélangée à 40 µL de NaOH (20 mM) et chauffé à 99 °C pendant 10 min. Après centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min, le surnageant contenant l'ADN a été conservé pour l'analyse PCR.

La région ITS (Internal Transcribed Spacer) codante pour l'ARNr 5.8S a été amplifiée en utilisant les amorces ITS1 et ITS4 permettant ainsi la discrimination entre les isolats *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* (White *et al.*, 1990). Les conditions de PCR décrites par Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) ont été utilisées. Les fragments amplifiés ont ensuite été analysés à l'aide d'un automate d'électrophorèse capillaire (MultiNA MCE202, Shimadzu).

2.5.2 Identification des levures *Brettanomyces*

Les isolats, pour lesquels un fragment à 485 pb (caractéristique du genre *Brettanomyces*) a été obtenu après amplification par PCR ITS, ont été retenus. Pour confirmer l'appartenance de ces isolats au genre *Brettanomyces*, une amplification par PCR nichée a été réalisée à l'aide de deux couples d'amorces DB1 (5'-AGAAGTTGAACGGCCGCATTTGCAC-3')/DB2 (5'-AGGATTGTTGACTCTCGCGGAGG-3') et DB3 (5'-CGGCATATCGAAGACAG-3')/DB4 (5'-CATCCTCGCCATAACAAC-3') (Ibeas *et al.*, 1996). Les fragments amplifiés ont ensuite été analysés à l'aide d'un automate d'électrophorèse capillaire (MultiNA MCE202, Shimadzu).

2.5.3 Génotypage par marqueurs microsatellites

L'extraction d'ADN, les conditions de PCR pour l'amplification des marqueurs microsatellites et l'analyse des amplicons ont été réalisées selon Avramova *et al.*, (2018) et reportés par Lebleux *et al.* (2020). Brièvement, 12 régions microsatellites ont été amplifiées et analysés par électrophorèse capillaire utilisant un séquenceur ABI 3130 XL (Albertin *et al.*, 2014). Les clones ont été définis comme des isolats présentant le même profil allélique pour les 12 marqueurs microsatellites testés ce qui a permis la constitution des groupes clonaux.

3. Résultats et discussion

3.1 Biodiversité fongique dans l'environnement des trois caves

La biodiversité fongique a été étudiée par Illumina Mi-Seq en collaboration avec le laboratoire de biologie à l'université de Bari et le Dr Mario Ventura. Les unités opérationnelles taxonomiques (OTUs) obtenus suite au séquençage ont été divisées en trois catégories : les OTUs appartenant à des genres de levures, les OTUs appartenant à des genres de moisissures et les OTUs non-identifiées. Les résultats obtenus pour les 3 caves et les 2 millésimes avant l'entonnage sont rassemblés dans le **tableau 1**, en fin d'entonnage dans le **tableau 2**, 2 mois après la fin de l'entonnage dans le **tableau 3**, 4 mois après dans le **tableau 4** et 8 mois après dans le **tableau 5**.

Tableau 1 : Pourcentages des unités opérationnelles taxonomiques (OTUs) (levures, moisissures et séquences non identifiées) obtenues avant l'entonnage pour les millésimes 2016 et 2017 sur les différents environnements des trois caves étudiées.

	Site	% d'OTUs	Environnements			
			Sol	Murs	Matériel vinaire	Fûts
Millésime 2016	B	Levures	22,4	5,7	40,3	25,7
		Moisissures	38,3	43,2	23,3	54
		Non-identifiées	39,3	51,1	36,4	20,3
	PR	Levures	2,1	4,4	3,9	1,9
		Moisissures	29,6	35,7	33	61,9
		Non-identifiées	68,3	59,9	63,1	36,2
	M	Levures	3,7	0,4	0,1	0,2
		Moisissures	14,3	22,4	46,6	27,8
		Non-identifiées	82	77,2	53,3	72
Millésime 2017	B	Levures	13,5	1	13,2	14,3
		Moisissures	35,6	54	9,5	65,8
		Non-identifiées	50,9	45	77,3	19,9
	PR	Levures	1,6	2	6,1	2,6
		Moisissures	13,5	36,5	34	14,4
		Non-identifiées	84,9	61,5	59,9	83
	M	Levures	2,5	-	6,1	0,9
		Moisissures	8,2	-	13,4	48,4
		Non-identifiées	89,3	-	80,5	50,7

- : OTUs non détectée

Tableau 2 : Pourcentages des unités opérationnelles taxonomiques (OTUs) (levures, moisissures et séquences non identifiées) obtenues en fin d'entonnage pour les millésimes 2016 et 2017 sur les différents environnements des trois caves étudiées.

	Site	% d'OTUs	Environnements			
			Sol	Murs	Matériel vinaire	Fûts
Millésime 2016	B	Levures	20,5	36,5	48,3	34,9
		Moisissures	41,3	26,4	10,6	33,1
		Non-identifiées	38,2	37,1	41,1	32
	PR	Levures	5,2	0,2	48,8	14,6
		Moisissures	21,3	42,1	26,8	55,1
		Non-identifiées	73,5	57,7	24,4	30,3
	M	Levures	4,4	-	16,5	0
		Moisissures	31,6	-	29	62,3
		Non-identifiées	64	-	54,5	37,7
Millésime 2017	B	Levures	9,3	13,3	26,7	17,2
		Moisissures	39,5	57	27	45,5
		Non-identifiées	51,2	29,7	46,3	37,3
	PR	Levures	1,3	3,8	45	5
		Moisissures	13	29,5	22	12,2
		Non-identifiées	85,7	66,7	33	82,8
	M	Levures	8,8	-	13,3	4,8
		Moisissures	6,4	-	38	34,5
		Non-identifiées	84,8	-	48,7	60,7

- : OTUs non détectée

Tableau 3 : Pourcentages des unités opérationnelles taxonomiques (OTUs) (levures, moisissures et séquences non identifiées) obtenues 2 mois après la fin de l'entonnage pour les millésimes 2016 et 2017 sur les différents environnements des trois caves étudiées.

Site	% d'OTUs	Environnements				
		Sol	Murs	Matériel vinaire	Fûts	
Millésime 2016	B	Levures	-	14,8	71,4	5,6
		Moisissures	-	49,7	7	77,9
		Non-identifiées	-	35,5	21,6	16,5
	PR	Levures	3,7	9,8	3,7	1,8
		Moisissures	19,8	71,4	29,7	37,2
		Non-identifiées	76,5	18,8	66,6	61
	M	Levures	2,4	21,6	32,5	2,5
		Moisissures	18	60,8	25	11
		Non-identifiées	79,6	17,6	42,5	86,5
Millésime 2017	B	Levures	24	6,4	47,5	13,9
		Moisissures	34,9	52,6	9,7	68,2
		Non-identifiées	41,1	41	42,8	17,9
	PR	Levures	1	56,7	64,2	36,4
		Moisissures	16,7	13,8	21,3	35,1
		Non-identifiées	82,3	29,5	14,5	28,5
	M	Levures	6,2	25,7	2,3	2,6
		Moisissures	17,4	44,8	81,4	1,4
		Non-identifiées	76,4	29,5	16,3	96

- : OTUs non détectée

Tableau 4 : Pourcentages des unités opérationnelles taxonomiques (OTUs) (levures, moisissures et séquences non identifiées) obtenues 4 mois après la fin de l'entonnage pour les millésimes 2016 et 2017 sur les différents environnements des trois caves étudiées.

Site	% d'OTUs	Environnements				
		Sol	Murs	Matériel vinaire	Fûts	
Millésime 2016	B	Levures	45,3	11,5	45,5	13,5
		Moisissures	22,1	48,5	12,6	76,5
		Non-identifiées	32,6	40	41,9	10
	PR	Levures	1,7	32,6	27,6	8
		Moisissures	24,6	25,9	28	42,5
		Non-identifiées	73,7	41,5	44,4	49,5
	M	Levures	47,9	27,6	1,8	0
		Moisissures	23,7	47,3	40,1	29,6
		Non-identifiées	28,4	25,1	58,1	70,4
Millésime 2017	B	Levures	5,2	6,3	81,5	24,8
		Moisissures	53	55	7,6	36,9
		Non-identifiées	41,8	38,7	10,9	38,3
	PR	Levures	0,2	5,6	7,9	3,7
		Moisissures	16,9	23	6,4	38,2
		Non-identifiées	82,9	71,4	85,7	58,1
	M	Levures	6,8	4,1	1,8	4
		Moisissures	7,2	33,1	30,7	9,2
		Non-identifiées	86	62,8	67,5	86,8

Tableau 5 : Pourcentages des unités opérationnelles taxonomiques (OTUs) (levures, moisissures et séquences non identifiées) obtenues 8 mois après la fin de l'entonnage pour les millésimes 2016 et 2017 sur les différents environnements des trois caves étudiées.

	Site	% d'OTUs	Environnements			
			Sol	Murs	Matériel vinaire	Fûts
Millésime 2016	B	Levures	14	14,4	40,5	33,9
		Moisissures	34,7	53,9	27,1	38,4
		Non-identifiées	51,3	31,7	32,4	27,7
	PR	Levures	0,4	7,3	10,8	1,9
		Moisissures	15,7	31,2	33,8	14
		Non-identifiées	83,9	61,5	55,4	84,1
	M	Levures	81,5	-	1	2,6
		Moisissures	7,7	-	39,8	96,3
		Non-identifiées	10,8	-	59,2	1,1
Millésime 2017	B	Levures	26	14,8	59,3	24,8
		Moisissures	31	55	27,1	60,9
		Non-identifiées	43	30,2	13,6	14,3
	PR	Levures	11,3	30,7	47,7	39,6
		Moisissures	19,7	25,9	18,7	26,5
		Non-identifiées	69	43,4	33,6	33,9
	M	Levures	18,7	30,9	19	4
		Moisissures	22,3	44,3	32	70,1
		Non-identifiées	59	24,8	49	25,9

- : OTUs non détectée

Les résultats rassemblés dans les tableaux 1 à 5 ne nous permettent pas actuellement d'étudier la biodiversité microbienne et ce pour plusieurs raisons :

- Pourcentage trop élevé de séquences non identifiées dans de nombreux échantillons qui peut même dépasser 90% rendant l'exploitation de ces résultats impossible pour le moment.
- Le pourcentage trop élevé n'est pas obtenu que pour un temps de prélèvement, ou pour une seule cave ou pour un seul environnement ; il apparait assez aléatoire et pourrait être lié à une mauvaise extraction de l'ADN de certains échantillons ou à un problème d'analyse bio-informatique. Des vérifications au niveau du pipeline sont actuellement en cours afin de voir si un problème est survenu au cours de l'analyse des séquences.

3.2 Populations microbiennes cultivables dans l'environnement des trois caves

Les niveaux des populations microbiennes cultivables (levures totales, bactéries lactiques et bactéries acétiques) ont été calculés par comptage des colonies développées sur boîte. Les résultats sont présentés par la moyenne de trois répétitions et sont exprimés en unités formant colonies par cm² (UFC/cm²).

- Populations levuriennes totales cultivables :

Les résultats mettent en évidence une très grande disparité de populations cultivables en fonction de l'environnement étudié. En effet, pour les 3 caves et pour tous les prélèvements effectués en 2016 et 2017, la population levurienne totale cultivable la plus élevée est observée sur le petit matériel utilisé en cave (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Populations levuriennes totales cultivables (UFC/cm²) durant l'élevage pour les millésimes 2016 et 2017 sur les différents environnements des trois caves étudiées. Les écarts-types sont marqués entre parenthèse.

		Levures totales cultivables (UFC/cm ²)						
Environnement	Site	Prélèvements						
		Avant entonnage	Fin Entonnage	2 mois après fin entonnage	4 mois après fin entonnage	8 mois après fin entonnage		
Millésime 2016	Sol	B	10 (±3)	40 (±4)	10	1	70 (±4)	
		PR	20 (±1)	10	2	2	90 (±20)	
		M	<1	2	2	4 (±1)	30 (±3)	
	Murs	B	30 (±3)	6×10 ² (±3×10 ¹)	70 (±1)	50 (±3)	7×10 ² (±3×10 ¹)	
		PR	60 (±30)	1	1×10 ² (±2×10 ¹)	10 (±2)	3×10 ³ (±4×10 ²)	
		M	ND	<1	ND	ND	ND	
	Matériel vinaire	B	1×10 ³ (±3×10 ²)	90 (±10)	2×10 ³ (±1×10 ²)	3×10 ⁴ (±3×10 ³)	3×10 ⁴ (±7×10 ³)	
		PR	3×10 ⁴ (±4×10 ³)	2×10 ⁴ (±2×10 ³)	40 (±10)	1×10 ⁴ (±4×10 ³)	3×10 ⁵ (±1×10 ⁴)	
		M	1×10 ³ (±2×10 ²)	6×10 ³ (±1×10 ³)	40 (±10)	5 (±1)	6×10 ² (±1×10 ²)	
	Fûts	B	1	10	ND	<1	5 (±1)	
		PR	10	10 (±1)	10	3	7×10 ² (±9×10 ¹)	
		M	ND	<1	1×10 ² (±1×10 ¹)	ND	ND	
	Millésime 2017	Sol	B	30 (±1)	1	10 (±1)	<1	3×10 ² (±1×10 ¹)
			PR	20 (±4)	20 (±1)	2×10 ² (±2×10 ¹)	10 (±1)	2×10 ² (±1×10 ¹)
			M	40 (±30)	10 (±1)	1	1	10
Murs		B	2	2×10 ² (±1×10 ¹)	20 (±3)	20 (±1)	30 (±3)	
		PR	1	2×10 ² (±1×10 ¹)	10 (±1)	5	1×10 ² (±1×10 ¹)	
		M	ND	ND	ND	ND	5 (±1)	
Matériel vinaire		B	2×10 ⁴ (±4×10 ³)	5×10 ³ (±3×10 ²)	4×10 ³ (±2×10 ²)	4×10 ³ (±5×10 ²)	2×10 ⁵ (±4×10 ³)	
		PR	4×10 ⁴ (±4×10 ³)	2×10 ⁵ (±1×10 ⁴)	1×10 ⁴ (±2×10 ³)	5×10 ⁴ (±4×10 ³)	2×10 ⁵ (±2×10 ⁴)	
		M	6×10 ³ (±2×10 ³)	1×10 ² (±1×10 ¹)	2×10 ² (±4×10 ¹)	3×10 ² (±5×10 ¹)	9×10 ² (±2×10 ²)	
Fûts		B	5	2	ND	ND	1	
		PR	90 (±3)	9×10 ² (±1×10 ²)	80 (±10)	10	30 (±10)	
		M	10 (±3)	10 (±1)	4×10 ² (±8×10 ¹)	2×10 ² (±3×10 ¹)	ND	

ND : Non Détecté

Pour la cave PR, la population levurienne sur le matériel vinaire est toujours supérieure comparée aux deux autres caves pour ce même environnement. Au contraire, une présence faible de levures totales est observée au niveau des fûts pour les deux millésimes et particulièrement au niveau de la cave B (**Tableau 6**). De plus, les populations levuriennes sont extrêmement faibles au niveau du sol et des murs pour les 3 caves et les deux millésimes ce qui indique que ces deux environnements ne sont pas favorables pour l'implantation des levures.

Quel que soit l'environnement et la cave, une augmentation plus ou moins marquée des populations levuriennes est observée 8 mois après entonnage (juillet 2016 et juillet 2017). Une légère augmentation de la température des caves pendant cette période (Simeray *et al.*, 2000 ; Ocón *et al.*, 2014 ; Barbaresi *et al.*, 2015), pourrait expliquer cette augmentation des populations levuriennes observées.

D'une manière générale, les populations sont plus élevées en 2017 qu'en 2016 quel que soit l'environnement étudié, excepté pour les populations sur les murs (**Tableau 6**). Le millésime 2016, caractérisé par un gel de printemps, a conduit à un volume de vins généré beaucoup plus faible par rapport à un millésime classique (comme l'a été 2017). Ceci pourrait alors expliquer la différence de populations observées entre les 2 millésimes.

- Populations de bactéries lactiques cultivables :

Quel que soit l'environnement étudié, les populations de bactéries lactiques sont beaucoup plus faibles comparées aux populations levuriennes et ce pour les trois caves (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Populations de bactéries lactiques cultivables exprimées (UFC/cm²) durant l'élevage pour les millésimes 2016 et 2017 sur les différents environnements des trois caves étudiées. Les écart-types sont marqués entre parenthèse.

		Bactéries lactiques cultivables (UFC/cm²)					
Environnement	Site	Prélèvements					
		Avant entonnage	Fin entonnage	2 mois après fin entonnage	4 mois après fin entonnage	8 mois après fin entonnage	
Millésime 2016	Sol	B	<1	ND	<1	<1	<1
		PR	1	2	<1	<1	<1
		M	<1	<1	<1	<1	5 (±1)
	Murs	B	1	20	ND	1	<1
		PR	ND	ND	ND	ND	ND
		M	<1	ND	ND	ND	<1
	Matériel vinaire	B	50 (±3)	30 (±10)	60 (±20)	3×10 ² (±2×10 ¹)	1×10 ⁴ (±3×10 ²)
		PR	1×10 ² (±1×10 ¹)	70 (±10)	ND	<1	2×10 ⁴ (±2×10 ³)
		M	ND	3×10 ³ (±2×10 ²)	ND	<1	<1
Fûts	B	ND	ND	ND	ND	ND	
	PR	<1	<1	ND	<1	30 (±4)	
	M	ND	<1	ND	ND	ND	
Millésime 2017	Sol	B	<1	<1	<1	ND	5
		PR	1	<1	10 (±1)	2	50 (±1)
		M	<1	<1	<1	<1	<1
	Murs	B	1	10	5	10 (±2)	4
		PR	ND	<1	<1	ND	5
		M	ND	ND	ND	ND	ND
	Matériel vinaire	B	1×10 ⁵ (±5×10 ³)	6×10 ⁴ (±7×10 ³)	1×10 ⁵ (±1×10 ⁴)	70 (±5)	4×10 ³ (±9×10 ²)
		PR	8×10 ² (±1×10 ²)	3×10 ³ (±6×10 ²)	2×10 ² (±3×10 ¹)	9×10 ⁴ (±4×10 ³)	3×10 ³ (±1×10 ²)
		M	60 (±3)	10 (±2)	ND	10 (±2)	10 (±2)
Fûts	B	ND	1	ND	ND	<1	
	PR	7×10 ² (±3×10 ²)	4×10 ² (±5×10 ¹)	<1	30 (±2)	10	
	M	ND	10	4×10 ² (±4×10 ¹)	ND	ND	

ND : Non Détecté

Comme observé pour les populations de levures totales, le matériel vinaire présente les populations de bactéries lactiques les plus élevées, particulièrement pour les caves PR et B, du fait que ce matériel vinaire est toujours en contact direct avec la matrice vin.

Des évolutions différentes de populations de bactéries lactiques sont observées au cours de l'élevage pour les trois caves sur le matériel vinaire, qui pourraient s'expliquer par des départs en fermentation malolactique (FML) différents au cours d'un même millésime. De plus, ces évolutions sont également différentes en fonction du millésime : par exemple les FML semblent avoir débutées suite à l'entonnage 2016, au début de l'été suivant pour B et PR et en 2017 au moment de l'entonnage pour la cave B et au printemps suivant pour la cave PR (**Tableau 7**).

Comme observé pour les populations de levures totales, l'ensemble de ces résultats laissent à penser que le sol et les murs ne sont pas des environnements favorables à l'implantation des bactéries lactiques.

- Populations de bactéries acétiques cultivables :

En raison du développement d'une forte population de moisissures sur le milieu GYC, ainsi que la présence d'autres bactéries, la visualisation des halos caractéristiques entourant les colonies de bactéries acétiques sur le milieu GYC a été difficile et a rendu le dénombrement de ces bactéries impossible pour le millésime 2016. Ainsi l'estimation de cette population est présentée sous forme de présence/absence. Par contre, pour le millésime 2017, les populations de bactéries ont été dénombrées sur le milieu GYC supplémenté par 2,75% (p/v) de Biphényle pour limiter le développement des moisissures (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Populations de bactéries acétiques cultivables durant l'élevage pour les millésimes 2016 et 2017 sur les différents environnements des trois caves étudiées. Les résultats sont exprimés par présence/absence pour le millésime 2016 et en UFC/cm² pour le millésime 2017. Les écart-types sont marqués entre parenthèse.

Bactéries acétiques cultivables (présence/absence - UFC/cm²)

Environnement	Site	Prélèvements						
		Avant entonnage	Fin entonnage	2 mois après fin entonnage	4 mois après fin entonnage	8 mois après fin entonnage		
Millésime 2016	Sol	B	ND	ND	ND	+	+	
		PR	ND	ND	ND	ND	ND	
		M	ND	ND	ND	ND	ND	
	Murs	B	ND	ND	ND	+	ND	
		PR	ND	ND	ND	ND	ND	
		M	ND	ND	+	+	ND	
	Matériel vinaire	B	+	+	ND	+	+	
		PR	ND	ND	ND	ND	ND	
		M	ND	ND	ND	ND	ND	
	Fûts	B	ND	+	ND	+	+	
		PR	ND	ND	+	+	+	
		M	ND	ND	ND	ND	ND	
	Millésime 2017	Sol	B	ND	ND	ND	ND	ND
			PR	ND	10	ND	ND	3
			M	ND	ND	ND	ND	ND
Murs		B	ND	ND	ND	ND	ND	
		PR	ND	ND	ND	ND	80 (±3)	
		M	1	ND	ND	ND	ND	
Matériel vinaire		B	5×10 ⁴ (±2×10 ³)	3×10 ⁴ (±2×10 ³)	2×10 ⁵ (±5×10 ⁴)	1×10 ² (±1×10 ¹)	2×10 ³ (±3×10 ²)	
		PR	ND	3×10 ³ (±1×10 ³)	10 (±2)	ND	4×10 ² (±1×10 ²)	
		M	4	ND	10	ND	ND	
Fûts		B	20 (±2)	ND	ND	ND	ND	
		PR	50 (±10)	2×10 ² (±4×10 ¹)	3	ND	50 (±2)	
		M	ND	2	ND	20 (±2)	ND	

ND : Non Détecté

Comme pour les levures totales et les bactéries lactiques, les niveaux de populations de bactéries acétiques les plus élevés sont observés au niveau du matériel vinaire et particulièrement pour la cave B. Plusieurs auteurs démontrent qu'une population de bactéries acétiques est toujours présente dans le vin tout le long du processus d'élevage, pouvant ainsi expliquer la présence de ces bactéries sur le matériel vinaire (Joyeux *et al.*, 1984 ; Millet et Lonvaud-Funel, 2000 ; Bartowsky et Henschke, 2008).

Pour le millésime 2017, les populations observées au niveau du matériel vinaire de la cave B (jusqu'à 2×10⁵ ±5×10⁴ UFC /cm²) sont supérieures par rapport aux deux autres caves (**Tableau 8**) et sont très élevées par rapport aux populations décrites dans le vin au cours de l'élevage (10² à 10³ UFC/mL) (Millet et Lonvaud-Funel, 2000 ; Bartowsky et Henschke, 2008). De plus, les

populations de bactéries acétiques ont été détectées à tous les temps d'élevage sur le matériel vinaire de la cave B alors que pour les autres caves (PR et M) elles ont été détectées uniquement à 2 ou 3 temps d'élevage (**Tableau 8**). Ce résultat peut être expliqué par la manipulation fréquente du vin dans la cave B tout le long du processus d'élevage. Ainsi, le matériel vinaire serait à l'origine de ces populations élevées.

Là encore, le matériel vinaire semble être l'environnement « source de contamination » et de transfert. Ainsi, une attention particulière doit être accordée à l'hygiène de ce matériel afin de limiter le risque de contamination des vins par les bactéries acétiques (exemple : piqûre acétique).

3.3 Présence de la levure *Brettanomyces bruxellensis* dans l'environnement des trois caves étudiées au cours du millésime 2016

La levure d'altération *Brettanomyces bruxellensis* dans l'environnement des trois caves a été recherchée au cours du millésime 2016. A partir de colonies prélevées sur milieu ITV, les isolats ont été identifiés comme appartenant à cette espèce par PCR nichée (Ibeas *et al.*, 1996). Quel que soit l'environnement étudié et le temps d'élevage choisi, aucun isolat appartenant à l'espèce *B. bruxellensis* n'a été identifié pour les caves PR et M alors que 57 isolats ont été identifiés pour la cave B (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Nombre d'isolats appartenant à l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* identifiés dans les différents environnements de la cave B.

Environnement	Prélèvements				
	Avant entonnage	Fin entonnage	2 mois après fin entonnage	4 mois après fin entonnage	8 mois après fin entonnage
Sol	0	0	0	0	0
Murs	0	0	0	0	0
Matériel vinaire	4	0	0	5	3
Fûts	3	2	0	15	0
Vin de cuves de transfert	Pas de prélèvement	Pas de prélèvement	Pas de prélèvement	25	Pas de prélèvement

Sur les 57 isolats, aucun n'a été détecté sur le sol et les murs. Seuls les WREs en contact direct avec le vin ont présenté des isolats appartenant à l'espèce *B. bruxellensis* : 12 isolats provenaient du matériel vinaire et 20 isolats sur l'extérieur des fûts (**Tableau 9**). Ces deux environnements peuvent alors être considérés comme niche écologique pour l'espèce *B. bruxellensis*, en accord avec les travaux de Chatonnet *et al.* (1992), Laureano *et al.* (2005), Barata *et al.* (2013) et González-Arenzana *et al.* (2013). De la même manière que pour les

bactéries acétiques, l'hygiène du matériel vinaire et des fûts est donc essentielle pour limiter le développement de cette levure dans l'environnement d'une cave.

Au cours du prélèvement réalisé 4 mois après la fin de l'entonnage, des cuves de transfert contenant du vin étaient présentes dans la cave : des prélèvements de vin ont ainsi été réalisés. Un total de 25 isolats a été identifié comme appartenant à l'espèce *B. bruxellensis* (**Tableau 9**). Ces résultats laissent à penser que le vin pourrait être également un environnement transitoire de contamination et/ou à l'origine de la présence de *B. bruxellensis* dans l'environnement de la cave.

3.4 Populations cultivables de *B. bruxellensis* dans les vins de la cave B pour le millésime 2017

Dans le but d'analyser les populations cultivables de *B. bruxellensis* présentes dans les vins élevés dans la cave B, des dénombrements sur milieu ITV ont été réalisés sur des vins du domaine et des vins de négoce présents dans la cave au cours de l'élevage du millésime 2017 (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Populations cultivables de levures *Brettanomyces* (UFC/mL) dans les vins de domaine et les vins de négoce de la cave B durant l'élevage du millésime 2017.

UFC/mL	Prélèvements			
	Fin entonnage	2 mois après fin entonnage	4 mois après fin entonnage	8 mois après fin entonnage
Vins de domaine	1×10^4	9×10^3	6×10^3	6×10^3
Vins de négoce	4.5×10^4	3.4×10^4	2.5×10^4	1.7×10^4

Quel que soit le temps d'élevage, les résultats mettent en évidence une population de *B. bruxellensis* supérieure dans les vins de négoce (en moyenne 3×10^4 UFC/mL) par rapport aux vins de domaine (en moyenne 8×10^3 UFC/mL). Ces niveaux de population sont similaires aux niveaux trouvés dans des vins contaminés par *B. bruxellensis* au cours de l'élevage (10^2 à 10^3 UFC/mL) (Renouf *et al.*, 2007).

Pour les deux types de vins, les populations de *B. bruxellensis* sont les plus élevées à la fin de l'entonnage et diminuent légèrement au cours de l'élevage (**Tableau 10**). Plusieurs auteurs décrivent l'étape d'élevage en fûts comme étant une étape critique pour le développement de *B. bruxellensis* dans le vin (Chatonnet *et al.*, 1992 ; Licker *et al.*, 1998 ; Renouf *et al.*, 2006 ; Suárez *et al.*, 2007).

Au regard des résultats obtenus, le vin est bien une niche écologique importante pour la levure *B. bruxellensis* et contribue à la présence de cette levure dans l'environnement de la cave et à la contamination des WREs. Ainsi, le contrôle des vins apparaît être une étape importante et nécessaire pour limiter le développement de cette levure dans l'environnement de la cave.

3.5 Dynamique de la levure *Brettanomyces bruxellensis* dans l'environnement de la cave B

La discrimination intraspécifique des 57 isolats obtenus dans la cave B (millésime 2016) a été réalisée par PCR microsatellites en collaboration avec le laboratoire Microflora (Bordeaux, France). Les résultats ont révélé que ces 57 isolats étaient répartis dans trois (CBS 2499-like, L14165-like et AWRI1608-like) des 6 groupes génétiques précédemment définis par Avramova *et al.* (2018) (**Tableau 11**). L'analyse des profils alléliques a permis l'identification de 27 groupes clonaux différents à l'intérieur de ces 3 groupes génétiques ce qui confirme la grande diversité génétique de cette espèce, comme déjà suggérée par plusieurs auteurs (Conterno *et al.*, 2006 ; Vigentini *et al.*, 2012 ; Albertin *et al.*, 2014 ; Avramova *et al.*, 2018). La majorité de ces groupes clonaux (21/27) appartiennent au groupe génétique AWRI1608-like, groupe caractéristique de la zone Est du vignoble national (communication personnelle Dr. Warren Albertin). En revanche, aucun des isolats n'appartient aux groupes génétiques AWRI1499-like, CBS 5512-like et L0308-like. Cibrario (2017) démontrent que certains groupes génétiques ne sont pas représentés ou pas introduits dans le vignoble bourguignon comme le groupe génétique L0308-like. De plus, cet auteur met en évidence que parmi 157 isolats de *B. bruxellensis* du vignoble bourguignon, les isolats appartenant aux groupes génétiques AWRI1499-like et CBS 5512-like sont faiblement représentés (30%). En plus des groupes génétiques définis par Avramova *et al.*, (2018), ces auteurs ont mis en évidence un lien entre la tolérance aux sulfites et l'appartenance à un groupe génétique. Cependant, les groupes génétiques CBS 2499-like, L14165-like et AWRI1608-like, identifiés au cours de notre étude sont classés comme des groupes non ou faiblement tolérants aux sulfites. Ainsi, dans cette étude il ne semble pas avoir de lien entre la présence des souches de *B. bruxellensis* dans l'environnement de la cave et leur tolérance aux sulfites.

Tableau 11 : Distribution des 57 isolats dans les 3 groupes génétiques décrits par Avramova *et al.* (2018).

Groupe génétique	Groupes clonaux et isolats
CBS 2499-like	A isolat 1
	B isolat 14
	C isolats 25, 27, 49
	D isolats 26, 30
L14165-like	E isolat 2
	F isolats 4, 6, 11, 17, 19
	G isolat 20
AWRI1608-like	H isolats 3, 10
	I isolats 5, 42
	J isolats 7, 28, 54
	K isolat 8
	L isolats 9, 44, 55
	M isolat 12
	N isolats 13, 15
	O isolat 16
	P isolats 18, 38, 46
	Q isolats 21, 22, 23, 29, 34, 35, 36, 39, 40, 43, 47, 48
	R isolats 24, 37
	S isolat 31
	T isolats 32, 52, 53
	U isolat 33
	V isolat 41
	W isolat 45
	X isolat 50
Y isolat 51	
Z isolat 56	
AA isolat 57	

La dynamique de la levure *B. bruxellensis* au cours de l'élevage (millésime 2016) dans la cave B a été réalisée par le suivi des 27 groupes de clones. La majorité des groupes étaient présents uniquement à un temps de prélèvement et sur un environnement. Seuls huit groupes clonaux (C, F, H, I, J, L, P et Q) ont été isolés à plusieurs temps d'élevage et sur différents environnements (matériel vinaire et fûts) et semblent donc récurrents dans l'environnement de la cave (**Tableau 12**). Ainsi, cinq types de dynamique sont observés :

Premièrement, les groupes clonaux F et H étaient présents sur le matériel vinaire avant entonnage et ont également été retrouvés sur ce même WRE, 4 mois après entonnage. De plus, le groupe clonal F a également été retrouvé au niveau des fûts 4 mois après entonnage (**Tableau 12**). Ces résultats mettent en évidence que ces deux groupes de clones sont capables de persister dans l'environnement de la cave et que la flore présente sur le matériel vinaire semble participer au transfert de *B. bruxellensis* vers d'autres WREs comme les fûts.

Deuxièmement, le groupe de clones I a été isolé sur le matériel vinaire avant entonnage et a aussi été retrouvé dans le vin 4 mois après entonnage (**Tableau 12**). Ces observations nous permettent de supposer que le vin pourrait être contaminé par la flore initialement présente sur le matériel vinaire de la cave.

Troisièmement, le groupe de clones J persistant sur l'extérieur des fûts (avant entonnage et 4 mois après entonnage) est retrouvé dans le vin 4 mois après entonnage (**Tableau 12**). Ainsi, des transferts potentiels de *B. bruxellensis* : fûts vers vin ou vin vers fûts pourraient exister.

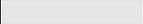
Quatrièmement, le groupe de clones L a été isolé sur l'extérieur des fûts à la fin de l'entonnage et a été retrouvé dans le vin 4 mois après entonnage et ensuite au niveau du matériel vinaire 8 mois après entonnage (**Tableau 12**). Ce résultat nous indique qu'un possible transfert a eu lieu depuis les fûts vers le vin et que, par la suite, l'entonnage du vin a permis le transfert vers le matériel vinaire. Donc, l'activité d'entonnage présente dans l'environnement de la cave explique potentiellement ce transfert.

Tableau 12 : Dynamique des groupes clonaux de *B. bruxellensis* isolés du matériel vinaire, des fûts et du vin au cours de l'élevage du millésime 2016 dans la cave B. Chaque nombre figurant dans le tableau correspond à un isolat.

Groupe génétique	Groupe clonal	Avant Entonnage		Fin Entonnage		T2 mois		T4 mois		T8 mois		T4 mois Vin
		Matériel vinaire	Fûts	Matériel vinaire	Fûts							
CBS 2499-like	A		1					14				
	B											
	C								25 - 27			49
	D								26 - 30			
L14165-like	E		2									
	F	4 - 6						11	17 - 19			
	G								20			
AWRI1608-like	H	3						10				
	I	5										42
	J		7						28			54
	K				8							
	L				9					55		44
	M							12				
	N							13	15			
	O								16			
	P								18			38 - 46
	Q								21 - 22 - 29			23 - 34 - 35 - 36 - 39 - 40 - 43 - 47 - 48
	R											24 - 37
	S								31			32 - 52 - 53
	T											33
	U											41
	V											45
	X											50
	Y											51
	Z										56	
AA										57		

 Groupes clonaux présents soit dans l'environnement de la cave soit dans le vin et qui ne transfèrent pas

 Groupes clonaux présents dans l'environnement de la cave et qui transfèrent vers le vin

 Groupes clonaux persistant dans l'environnement de la cave et/ou transfèrent vers d'autres environnements

 Groupes clonaux persistant dans l'environnement de la cave et qui transfèrent potentiellement vers le vin

 Groupes clonaux présents dans le vin et sur l'extérieur des fûts au même moment de prélèvement

 Groupes clonaux présents dans l'environnement de la cave, qui transfèrent vers le vin et persistent

Cinquièmement, les groupes clonaux C, P et Q isolés sur l'extérieur des fûts 4 mois après entonnage ont également été retrouvés dans le vin à ce même temps (**Tableau 12**). Ce résultat nous indique qu'un transfert potentiel a eu lieu entre le vin et les fûts. Ainsi, ces résultats confirment les observations précédentes et que l'étape d'entonnage est une étape importante pour la dissémination de la levure *B. bruxellensis* dans l'environnement dans la cave.

Ainsi, parmi les différents groupes clonaux obtenus au cours de cette étude, la majorité des groupes clonaux (73%) ne sont présents que ponctuellement. Cependant, 27% de ces groupes clonaux semblent potentiellement transférer dans l'environnement de la cave par le matériel vinaire et le vin notamment et apparaissent donc potentiellement persistants dans l'environnement de la cave. Dans le but d'évaluer d'approfondir les connaissances sur les mécanismes permettant la persistance de *B. bruxellensis* dans l'environnement d'une cave d'élevage, la capacité à former des biofilms pour cette espèce de levure a été étudiée.

3.6 Capacité à persister dans le vin de deux souches de *Brettanomyces bruxellensis* isolées de l'environnement de la cave

Dans le cadre d'une collaboration avec Manon Lebleux, doctorante au laboratoire VALMiS, la capacité de différentes souches de *B. bruxellensis* à former des biofilms et à persister dans le vin a été réalisée. Parmi les différentes souches, deux souches, la souche 11 (groupe clonal F) et la souche 14 (groupe clonal B), ont été sélectionnées en fonction de leurs dynamiques et étudiées de manière plus approfondie :

- la souche 11 a été retrouvée sur les différents environnements (matériel vinaire, fûts et vin) et à plusieurs temps au cours de l'élevage.
- la souche 14 a été uniquement retrouvée sur un seul environnement et à un seul temps au cours de l'élevage.

Des biofilms ont été formés pendant 7 jours sur coupons d'acier en milieu YPD et ont ensuite été immergées dans du vin. La capacité à persister dans ce milieu a été évaluée en suivant au cours du temps (2 h, 24 h, 48 h, 7 j et 14 jours) les niveaux de population présentes sur le coupon et celles libérées dans le vin.

Les résultats de cette étude ont mis en évidence que ces deux souches présentent différents comportements dans le vin. La souche 11 (souche récurrente) présente une meilleure capacité à se développer sur coupon d'acier et à persister dans le vin alors que la souche 14 (souche non-

récurrente) est plus affectée par le vin (**Annexe 1**). Ainsi la présence et la récurrence de *B. bruxellensis* dans l'environnement d'une cave pourrait être expliquée en partie par la présence de souches capables de former des biofilms, mode de vie permettant une meilleure résistance aux stress environnementaux (Verstrepen and Klis, 2006 ; Tek *et al.*, 2018).

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication scientifique acceptée dans « *International Journal of Food Microbiology* » (**Annexe 1**).

4. Conclusion

Au regard des résultats obtenus dans cette étude, le sol et les murs de la cave ne semblent pas être des environnements favorables au développement et à l'implantation des populations microbiennes (levures et bactéries) en raison des faibles populations cultivables observées. Par contre, les compartiments en contact direct avec le vin, plus particulièrement le matériel vinaire et dans une moindre mesure les fûts, sont une niche écologique pour les flores d'altération et plus particulièrement pour *B. bruxellensis*. De plus, l'étude de la dynamique de *B. bruxellensis* au cours de l'élevage a mis en évidence que le matériel vinaire, les fûts et le vin semblent contribuer au transfert et probablement à la persistance de cette levure dans l'environnement de la cave. De plus il semble que les souches récurrentes présentent des capacités de résistance plus importante.

Ainsi, pour limiter le développement et les transferts de populations d'altération dans les vins, il semble nécessaire d'apporter un soin particulier à l'hygiène du matériel vinaire (pipettes, intérieur tuyaux, robinets, seaux, cuves de transfert ...) et mettre en place des contrôles avant leur arrivée de vins dans la cave.

Références :

- Albertin W, Panfili A, Miot-Sertier C *et al.* Development of microsatellite markers for the rapid and reliable genotyping of *Brettanomyces bruxellensis* at strain level. *Food Microbiol* 2014;**42**:188–95.
- Avramova M, Cibrario A, Peltier E *et al.* *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution. *Sci Rep* 2018;**8**, DOI: 10.1038/s41598-018-22580-7.
- Barata A, Laureano P, D'Antuono I *et al.* Enumeration and Identification of 4-Ethylphenol Producing Yeasts Recovered from the Wood of Wine Ageing Barriques after Different Sanitation Treatments. *Journal of Food Research* 2013;**2**:p140.
- Barbaresi A, Torreggiani D, Benni S *et al.* Indoor air temperature monitoring: A method lending support to management and design tested on a wine-aging room. *Building and Environment* 2015;**86**:203–10.
- Bartowsky EJ, Henschke PA. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine -- a review. *Int J Food Microbiol* 2008;**125**:60–70.
- Belin J-M. Contribution a l'étude des levures des chais- taxonomie, répartition des levures. *Mycopathologia* 1979;**67**:67–81.
- Bokulich NA, Ohta M, Richardson PM *et al.* Monitoring Seasonal Changes in Winery-Resident Microbiota. Mormile MR (ed.). *PLoS ONE* 2013;**8**:e66437.
- Chatonnet P, Dubourdie D, Boidron J *et al.* The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1992;**60**:165–78.
- Cibrario A. Diversité Génétique et Phénotypique de l'Espèce *Brettanomyces bruxellensis*. Influence sur son Potentiel d'Altération des Vins Rouges. 2017.
- Conterno L, Joseph CML, Arvik TJ *et al.* Genetic and Physiological Characterization of *Brettanomyces bruxellensis* Strains Isolated from Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 2006;**57**:139–47.
- Edwards CG, Cartwright ZM. Application of Heated Water to Reduce Populations of *Brettanomyces bruxellensis* Present in Oak Barrel Staves. *South African Journal of Enology and Viticulture* 2019;**40**, DOI: 10.21548/40-1-3008.
- Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F *et al.* Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol* 1999;**49 Pt 1**:329–37.
- Garijo P, Santamaría P, López R *et al.* The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. *International Journal of Food Microbiology* 2008;**125**:141–5.
- González-Arenzana L, Santamaría P, López R *et al.* Microwave technology as a new tool to improve microbiological control of oak barrels: A preliminary study. *Food Control* 2013;**30**:536–9.

- Grangeteau C, Gerhards D, von Wallbrunn C *et al.* Persistence of Two Non-*Saccharomyces* Yeasts (*Hanseniaspora* and *Starmarella*) in the Cellar. *Frontiers in Microbiology* 2016;**7**.
- Guzzon R, Bernard M, Barnaba C *et al.* The impact of different barrel sanitation approaches on the spoilage microflora and phenols composition of wine. *J Food Sci Technol* 2017;**54**:810–21.
- Guzzon R, Widmann G, Malacarne M *et al.* Survey of the yeast population inside wine barrels and the effects of certain techniques in preventing microbiological spoilage. *Eur Food Res Technol* 2011;**233**:285–91.
- Gweon HS, Oliver A, Taylor J *et al.* PIPITS: an automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. *Methods in Ecology and Evolution* 2015;**6**:973–80.
- Ibeas JI, Lozano I, Perdigonés F *et al.* Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl Environ Microbiol* 1996;**62**:998–1003.
- Jackson RS. *Wine Science: Principles and Applications*. First edition. Academic Press, 1994.
- Joyeux A, Lafon-Lafourcade S, Ribéreau-Gayon P. Evolution of Acetic Acid Bacteria During Fermentation and Storage of Wine. *Appl Environ Microbiol* 1984;**48**:153–6.
- Laureano P, D'Antuono I, Barata A *et al.* Efeito de diferentes tratamentos de sanificação na população de *Dekkera bruxellensis* isolada da madeira de barricas. *Enologia-Revista Da Associação Portuguesa de Enologia* 2005:3–8.
- Lebleux M, Abdo H, Coelho C *et al.* New advances on the *Brettanomyces bruxellensis* biofilm mode of life. *International Journal of Food Microbiology* 2020;**318**:108464.
- Licker JL, Acree TE, Henick-Kling T. What Is “Brett” (*Brettanomyces*) Flavor?: A Preliminary Investigation. In: Waterhouse AL, Ebeler SE (eds.). *Chemistry of Wine Flavor*. Vol 714. American Chemical Society, 1998, 96–115.
- Mercado L, Dalcero A, Masuelli R *et al.* Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiol* 2007;**24**:403–12.
- Millet V, Lonvaud-Funel A. The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Lett Appl Microbiol* 2000;**30**:136–41.
- Ocón E, Garijo P, Sanz S *et al.* Analysis of airborne yeast in one winery over a period of one year. *Food Control* 2013;**30**:585–9.
- Ocón E, Gutiérrez AR, Garijo P *et al.* Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. *Food Microbiology* 2010;**27**:1023–7.
- Ocón E, Gutiérrez AR, Garijo P *et al.* Factors of Influence in the Distribution of Mold in the Air in a Wine Cellar. *Journal of Food Science* 2011;**76**:M169–74.

- Ocón E, Gutiérrez AR, Garijo P *et al.* Influence of Winery Age and Design on the Distribution of Airborne Molds in Three Rioja Wine Cellars. *Am J Enol Vitic* 2014;**65**:479–85.
- Pérez-Martín F, Seseña S, Fernández-González M *et al.* Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. *International Journal of Food Microbiology* 2014;**190**:44–53.
- Peynaud E, Domercq S. A Review of Microbiological Problems in Wine-Making in France. *Am J Enol Vitic* 1959;**10**:69–77.
- Picco AM, Rodolfi M. Assessments of Indoor Fungi in Selected Wineries of Oltrepo Pavese (Northern Italy) and Sottoceneri (Switzerland). 2004:8.
- Renouf V, Falcou M, Miot-Sertier C *et al.* Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *J Appl Microbiol* 2006;**100**:1208–19.
- Renouf V, Lonvaud-Funel A, Coulon J. The origin of *Brettanomyces bruxellensis* in wines: a review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 2007;**41**:161–73.
- Sabate J, Cano J, Esteve-Zarzoso B *et al.* Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological Research* 2002;**157**:267–74.
- Sangorrín MP, Lopes CA, Giraud MR *et al.* Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. *International Journal of Food Microbiology* 2007;**119**:351–7.
- Santamaría P, López R, López E *et al.* Permanence of yeast inocula in the winery ecosystem and presence in spontaneous fermentations. *Eur Food Res Technol* 2008;**227**:1563–7.
- Schmid F, Grbin P, Yap A *et al.* Relative Efficacy of High-Pressure Hot Water and High-Power Ultrasonics for Wine Oak Barrel Sanitization. *Am J Enol Vitic* 2011;**62**:519–26.
- Simeray J, Mandin D, Chaumont J-P. Annual variations of airborne fungal propagules in two wine cellars in French Jura. *Cryptogamie Mycologie* 2000;**21**:163–9.
- Simeray J, Mandin D, Mercier M *et al.* Survey of viable airborne fungal propagules in French wine cellars. *Aerobiologia* 2001;**17**:19–24.
- Stanga M. *Sanitation: Cleaning and Disinfection in the Food Industry*. Wiley. Weinheim, 2010.
- Suárez R, Suárez-Lepe JA, Morata A *et al.* The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry* 2007;**102**:10–21.
- Taylor DL, Walters WA, Lennon NJ *et al.* Accurate Estimation of Fungal Diversity and Abundance through Improved Lineage-Specific Primers Optimized for Illumina Amplicon Sequencing. *Appl Environ Microbiol* 2016;**82**:7217–26.

Tek EL, Sundstrom JF, Gardner JM et al. 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* 2018;**94**, DOI: 10.1093/femsec/fix188.

Verstrepen KJ, Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* 2006;**60**:5–15.

Vigentini I, De Lorenzis G, Picozzi C et al. Intraspecific variations of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* genome studied by capillary electrophoresis separation of the intron splice site profiles. *International Journal of Food Microbiology* 2012;**157**:6–15.

Werner O, Ros RM, Guerra J. Direct amplification and NaOH extraction: two rapid and simple methods for preparing bryophyte DNA for polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Bryology* 2002;**24**:127–31.

White T, Bruns T, Lee S et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 1990:315–22.

Yap A, Jiranek V, Grbin P et al. Studies on the application of high-power ultrasonics for barrel and plank cleaning and disinfection. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal* 2007;**3**:96–104.

Conclusions et perspectives

Les objectifs de ce travail de thèse étaient l'étude de la biodiversité et de l'évolution des populations fongiques présentes dans les environnements reliés au vin (WREs = Wine Related Environments) et plus spécifiquement dans une nouvelle cuverie et dans trois caves d'élevage. Dans ce cadre-là, la biodiversité a été caractérisée suivant deux approches différentes. D'une part, la biodiversité fongique a été analysée à un niveau interspécifique par la méthode de séquençage à haut débit Illumina Mi-Seq pour une meilleure compréhension de la complexité des populations colonisant les WREs. D'autre part, la biodiversité intraspécifique a également été étudiée pour certaines espèces d'intérêt (*Saccharomyces cerevisiae*) et d'altération (*Brettanomyces bruxellensis*) dans le but d'étudier leurs dynamiques et leur capacité d'implantation et de persistance dans les WREs.

Dans un premier temps, l'étude de la biodiversité fongique dans une nouvelle cuverie a été réalisée au niveau du sol, des murs et du matériel vinaire, avant l'arrivée de la première vendange et ensuite au cours des deux millésimes suivants. Les résultats de ce travail ont permis d'apporter de nouvelles connaissances quant à l'établissement d'un consortium fongique au sein d'une nouvelle cuverie, un travail qui jusqu'à présent n'a jamais été réalisé. En effet, quel que soit l'environnement analysé, un consortium fongique de départ avant l'arrivée de la première vendange a été mis en évidence qui est constitué d'une flore persistante non spécifique à l'environnement de la cuverie. Cette flore est composée de genres tels que *Aureobasidium*, *Alternaria*, *Didymella* et *Filobasidium* qui semblent être adaptés à tous les environnements naturels ou anthropiques au regard de leur caractère ubiquiste (Flannigan, 2001 ; Thomma, 2003 ; Nagahama, 2006 ; Egbuta *et al.*, 2016). Cependant, d'autres genres semblent présenter une adaptation à certains environnements spécifiques de la cuverie comme le genre *Candida* qui est présent avant l'arrivée de la vendange sur le sol de la cuverie et persiste au cours des 2 millésimes étudiés alors qu'il est introduit *via* la vendange pour les autres environnements. De plus, les résultats obtenus ont mis en évidence que certains genres œnologiques, par exemple *Hanseniaspora*, *Starmerella* etc. mais également *Saccharomyces* semblent être introduits dans l'environnement de la cuverie soit par les vendanges, soit par des transferts potentiels entre les différents WREs. Cependant, l'environnement de la cuverie ne semble pas favorable à l'installation de ces genres qui sont ainsi qualifiées, dans cette étude, de genres peu persistants. En effet, ces genres peu persistants, adaptés au milieu moût de raisin/vin de part leur métabolisme, ne semblent pas pouvoir s'adapter et présenter des capacités de persistance

dans un environnement stressant et pauvre nutritionnellement tel que l'environnement d'une cuverie (sol, murs, ...).

A l'heure actuelle, cette étude est la première réalisée dans une nouvelle cuverie sur deux millésimes utilisant une méthode de séquençage à haut débit pour étudier l'établissement du consortium fongique (levures et moisissures). Or, les populations fongiques ne sont pas les seules populations qui peuvent être présentes dans l'environnement d'une nouvelle cuverie. Ainsi, pour avoir une vision plus complète de l'établissement du consortium microbien dans une nouvelle cuverie, il serait intéressant d'étudier la biodiversité et l'évolution des populations bactériennes au cours du temps. Cette étude permettrait également de répondre aux questions suivantes : existe-t-il des équilibres entre les populations fongiques et bactériennes ? Est-ce que ces équilibres ont une influence sur la biodiversité des populations colonisant les WREs de la nouvelle cuverie ?

De plus, sur une période de deux millésimes (durée de l'étude), le consortium fongique de la nouvelle cuverie a évolué et a été enrichi par des genres provenant des vendanges. Or, plusieurs études ont déjà mis en évidence que la biodiversité fongique des baies de raisin et des moûts de raisin varie chaque année en fonction de plusieurs facteurs (état sanitaire des raisins, maturité des raisins, climat, localisation géographique...) (Barata *et al.*, 2008 ; Brilli *et al.*, 2014 ; Taylor *et al.*, 2014 ; Salvetti *et al.*, 2016). Ces changements de biodiversité des moûts de raisin amènent plusieurs questions : est-ce que des genres fongiques seront nouvellement introduits dans l'environnement de la cuverie par les futures vendanges ? Est-ce que ces genres seront adaptés aux conditions de l'environnement de la cuverie ? Est-ce que ces genres induiront des déséquilibres au niveau du consortium microbien déjà présent ? Afin de répondre à ces questionnements, il serait donc intéressant de suivre l'évolution des populations fongiques (et aussi bactériennes) durant les prochains millésimes.

Au cours de cette étude, des interactions potentielles entre certains genres ont été suggérées. Par exemple, la présence importante du genre *Alternaria* est toujours accompagnée d'une faible présence du genre *Cladosporium*. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la persistance des flores fongiques dans l'environnement de la cuverie, il serait donc intéressant de réaliser des travaux plus approfondis sur les types d'interactions qui peuvent exister entre les genres isolés au cours de cette étude. Ces travaux permettront de voir si certains genres fongiques colonisant les WREs de la cuverie présentent une activité antagoniste inhibant l'installation et la persistance d'autres genres.

Dans un deuxième temps, la dynamique de la flore indigène *Saccharomyces cerevisiae* a été analysée dans le but de mieux comprendre si cette espèce est capable de s'implanter dans l'environnement de la nouvelle cuverie. D'une part, la recherche de souches de *S. cerevisiae* a été réalisée dans l'environnement de la nouvelle cuverie (sol, murs et matériel vinaire) avant l'arrivée de la première vendange. Aucun isolat appartenant à cette espèce n'a été isolé dans l'environnement de la nouvelle cuverie avant l'arrivée de la première vendange. Cependant, par séquençage à haut débit, le genre *Saccharomyces* a été détecté mais à un taux très faible au niveau du matériel ancien (0,1%) probablement dû à la présence de résidus de moûts de raisin/vins et au niveau du sol toujours à un taux très faible (0,3%) probablement grâce à un potentiel transfert depuis le matériel vinaire par l'activité humaine. Ce résultat confirme que le genre *Saccharomyces* n'est pas spécifique de l'environnement de la cuverie et que sa présence est en lien avec l'activité des fermentations alcooliques. D'autre part, dans le but de trouver l'origine des souches de *Saccharomyces* colonisant l'environnement de la nouvelle cuverie, la recherche de souches de *S. cerevisiae* a été réalisée : (i) dans le pied de cuve utilisé la première année (2016) et (ii) dans les moûts de raisin et vins au cours de cette première année et lors du millésime suivant. Les résultats montrent un début de colonisation des WREs de la cuverie par quelques souches indigènes de *S. cerevisiae* retrouvées dans le pied de cuve et dans les moûts de raisin. Les résultats mettent ainsi en évidence que les WREs de la cuverie (particulièrement le matériel vinaire) peuvent être colonisés par des souches de *S. cerevisiae* provenant de fermentations spontanées. De plus, le matériel vinaire semble participer à la dissémination de souches vers les moûts de raisin confirmant que ce WRE et les flores présentes contribuent au cours du processus de vinification. Récemment, l'implication de la flore de cuverie a également été mise en évidence pour des espèces de levures non-*Saccharomyces* (*Hanseniaspora guilliermondii* et *Hanseniaspora uvarum*) (Grangeteau *et al.*, 2016a). Ainsi, étant donné que l'ensemble des isolats analysés avant l'arrivée de la première vendange appartenaient aux levures non-*Saccharomyces*, il serait donc intéressant d'étudier la dynamique de ces isolats au cours du temps. Cette analyse permettrait de voir si les souches présentes avant l'arrivée de la première vendange sont impliquées dans l'établissement du consortium microbien de la nouvelle cuverie et si ces souches persistent au cours des futures fermentations.

Pour aller plus loin dans la compréhension des facteurs contribuant à la présence de *S. cerevisiae*, une étude de la capacité à former des biofilms sur acier inoxydable a été réalisée pour différentes souches isolées au cours de cette étude et ayant des persistances différentes. Les résultats mettent en évidence la capacité de toutes les souches étudiées à former des

biofilms. Cependant, après 48 h de développement, les souches « colonisatrices » (présentes dans le pied de cuve, au cours des FAs et sur les WREs de la cuverie) semblent présenter une capacité plus élevée par rapport aux souches non persistantes. Donc, la capacité de *S. cerevisiae* à former des biofilms pourrait être un facteur contribuant à sa persistance dans l'environnement de la cuverie. Par contre, ces observations restent à confirmer en réalisant une étude sur : (i) un nombre plus élevé de souches, (ii) la formation de biofilms dans le vin, (iii) la formation de biofilms plus âgés et (iv) la formation de biofilms sur différents types de supports.

Chez *S. cerevisiae*, le gène *FLO11* code une protéine (adhésine) décrite comme impliquée dans l'adhésion aux surfaces solides et dans le changement de l'hydrophobicité de la surface des cellules (Zara *et al.*, 2009). Ce gène est également décrit comme présentant un polymorphisme élevé tout comme son promoteur associé (*FLO11* promoter) (Figaldo *et al.*, 2006). Il serait ainsi intéressant d'étudier s'il existe une corrélation entre le niveau de persistance de ces souches et le polymorphisme de ce gène.

S. cerevisiae est une espèce qui peut avoir des niveaux de ploïdie variables (diploïde, aneuploïde et polyploïde) (Querol *et al.*, 2003) qui pourraient jouer un rôle dans la persistance de cette espèce dans l'environnement. Ainsi, l'étude de l'état de ploïdie des isolats de *S. cerevisiae* pourrait également être une perspective intéressante qui permettrait de voir si les souches « colonisatrices » sont génétiquement différentes des souches non persistantes.

Toujours dans l'optique de caractériser les mécanismes mis en place par *S. cerevisiae* pour persister dans l'environnement de la cuverie, il serait intéressant de réaliser une étude phénotypique approfondie sur les souches obtenues au cours de cette étude. Cette étude phénotypique peut être réalisée sur plusieurs axes : (i) les besoins nutritionnels, (ii) la résistance au SO₂, (iii) les cinétiques de croissance (phase de latence et temps de génération), (iv) la capacité à sporuler et (v) la capacité à entrer dans l'état VNC (Viable mais Non-Cultivable) pour voir si des différences peuvent être observées entre les souches « colonisatrices » et les souches non persistantes.

Dans le cadre de ce travail de thèse, un deuxième environnement relié au vin a été étudié : la cave d'élevage. Deux objectifs ont été fixés pour cette partie : (i) l'étude de la biodiversité des flores microbiennes totales dans l'environnement de trois caves d'élevage sur une période de deux millésimes (2016 et 2017) et (ii) l'étude de la dynamique de la levure *Brettanomyces bruxellensis* au cours de l'élevage. Les pourcentages trop élevés de séquences non-identifiées obtenus au cours du séquençage Illumina Mi-Seq n'ont pas permis, pour le moment, l'étude de la biodiversité des populations fongiques. L'obtention de ces résultats

pourrait être liée soit à une mauvaise extraction de l'ADN ou à un problème d'analyse bio-informatique. Des vérifications au niveau du pipeline sont actuellement en cours afin de voir si un problème est survenu au cours de l'analyse des séquences. Une fois le problème résolu, cette étude permettra non seulement de décrire la biodiversité fongique des différents WREs des trois caves d'élevage étudiées, mais également de comparer le type de flore présente en fonction des pratiques œnologiques associées. Par exemple, est-ce qu'un domaine utilisant des doses plus élevées de SO₂ présente une flore spécifique comparé à un domaine utilisant des doses classiques ? Est-ce que l'utilisation de starters microbiens, pour initier la FA et/ou la FML, a une influence sur la biodiversité de la flore de cave ? De plus, l'accès à la biodiversité fongique totale permettrait aussi d'établir des corrélations potentielles entre la biodiversité fongique totale, les pratiques œnologiques des trois caves et la présence de flore d'altération comme par exemple la levure *B. bruxellensis*. La mise en évidence de ces corrélations permettrait de répondre à plusieurs questions : est-ce qu'une cave d'élevage ayant des contaminations par la levure *B. bruxellensis* présente une flore résidante différente facilitant l'installation de cette levure ? Est-ce que des équilibres existent entre la présence de *B. bruxellensis* et d'autres genres fongiques ?

En parallèle de l'étude globale par séquençage à haut débit, les populations microbiennes cultivables ont été dénombrées pour les quatre différents WREs (sol, murs, matériel vinaire et extérieur des fûts) pour les trois caves d'élevage et dans quelques vins pour une cave. Les résultats mettent en évidence que le sol et les murs de la cave ne semblent pas être des environnements favorables au développement et à l'implantation des populations microbiennes (levures et bactéries) en raison des faibles populations cultivables retrouvées. Par contre, les environnements qui présentent les populations microbiennes les plus élevées, pour les deux millésimes et les trois caves, sont les WREs en contact direct avec le vin et plus particulièrement le matériel vinaire. Ce dernier est aussi l'environnement qui présente les populations cultivables de microorganismes d'altération (bactéries acétiques et *B. bruxellensis*) les plus élevées.

Concernant spécifiquement la dynamique de *B. bruxellensis* au cours de l'élevage, les résultats mettent en évidence la présence de deux types de souches : des souches récurrentes et des souches non-récurrentes. La présence de souches récurrentes sur le matériel vinaire et sur l'extérieur des fûts pourrait être à l'origine de la contamination de vins au cours de l'élevage. Ainsi, pour diminuer les risques d'altération du vin liée au développement de ces différentes flores (bactéries acétiques et *B. bruxellensis*) au cours de l'élevage, une attention particulière doit être accordée à l'hygiène du matériel vinaire. Les résultats ont mis en évidence qu'une

autre source potentielle de contamination de l'environnement de la cave serait les vins et plus particulièrement les vins apportés de manière exogène par les cuves de transfert. Ainsi, des contrôles systématiques sur les vins avant leur arrivée dans la cave et également au cours de l'élevage sont essentiels pour diminuer le risque de contamination des WREs de la cave.

Dans le but de mieux caractériser les facteurs contribuant à la persistance et à la récurrence de *B. bruxellensis* dans l'environnement d'une cave d'élevage, une étude sur la capacité à former des biofilms et à persister dans le vin a été réalisée sur deux souches différentes (une souche récurrente et une souche non-récurrente). Les résultats obtenus montrent que la souche récurrente semble présenter une meilleure capacité à se développer en biofilm et à persister dans le vin alors que la souche non-récurrente est plus affectée par le vin. Pour la première fois, ces observations mettent en évidence que la formation de biofilms et la capacité à persister dans le vin semblent être un facteur qui contribuerait à la persistance de *B. bruxellensis* dans la cave. Par contre, ces observations restent à confirmer sur un nombre plus élevé de souches. Si cette hypothèse s'avère vérifiée, il sera nécessaire de développer des techniques de nettoyage adaptées quant à la limitation des contaminations par cette levure. Il faudra également tenir compte du fait que la levure *B. bruxellensis* est décrite, pour la première fois, comme capable de produire des structures appelées « chlamydospores-like ». Ces structures sont décrites comme impliquées dans la résistance à des conditions stressantes chez d'autres espèces levuriennes (Linx et Heitman, 2005 ; Staib et Morschhäuser, 2007). Ainsi, ces « chlamydospores-like » pourraient également contribuer la persistance de la levure dans l'environnement vinicole.

Le caractère persistant de l'espèce *B. bruxellensis* est un réel problème pour la filière viti-vinicole et à l'origine de pertes économiques. Afin de limiter son développement et/ou de l'éliminer, en tenant compte du contexte actuel de diminution des intrants, une des pistes potentielles serait l'utilisation d'agents de biocontrôle. A partir des données obtenues et des corrélations potentielles qui pourraient être établies entre présence/absence de cette levure et biodiversité fongique, la recherche d'antagonismes pourrait être envisagée pour sélectionner des microorganismes capables d'éliminer l'espèce *B. bruxellensis* sans impacter le processus de vinification. Cette recherche pourrait cibler les genres fongiques mais également les genres bactériens. Dans ce dernier cas, la biodiversité bactérienne de caves d'élevage pourrait être étudiée de la même manière que la biodiversité fongique.

Ce travail de thèse a permis, pour la première fois, d'étudier l'évolution du consortium fongique dans une cuverie neuve avant l'arrivée de la première vendange et pendant les deux millésimes suivants. Il pourrait donc être envisagé de réaliser ce même travail dans une nouvelle cave d'élevage. Ce travail permettra de comprendre comment un consortium fongique s'établit dans l'environnement d'une cave neuve, sujet qui n'a jamais été étudié pour le moment. De plus, ce travail permettra de répondre à plusieurs questionnements : Est-ce qu'un consortium fongique est déjà présent dans l'environnement d'une nouvelle cave avant l'arrivée des fûts ? Est-ce que ce consortium fongique de départ est enrichi par les activités qui peuvent avoir lieu dans la cave tels que l'entonnage ou l'ouillage des fûts ? Est-ce que les genres introduits par ces activités sont adaptés aux conditions de l'environnement de la cave et persistent au cours du temps ? Est-ce que les procédures de nettoyage et désinfection du matériel vinaire et des fûts engendrent des déséquilibres du consortium fongique ?

Références bibliographiques

- Aadt, I., Kohler, A., Gognies, S., Budin, J., Sandt, C., Belarbi, A., Manfait, M., & Sockalingum, G. D. (2010). FTIR spectroscopic discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* strains. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(9), 793–801. <https://doi.org/10.1139/W10-062>
- Agnolucci, M., Vigentini, I., Capurso, G., Merico, A., Tirelli, A., Compagno, C., Foschino, R., & Nuti, M. (2009). Genetic diversity and physiological traits of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from Tuscan Sangiovese wines. *International Journal of Food Microbiology*, 130(3), 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.025>
- Agnolucci, M., Rea, F., Sbrana, C., Cristani, C., Fracassetti, D., Tirelli, A., & Nuti, M. (2010). Sulphur dioxide affects culturability and volatile phenol production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1–2), 76–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.022>
- Aguilar Uscanga, M. G., Delia, M. L., & Strehaiano, P. (2000). Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis* : Growth and physiology in batch and chemostat cultures. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(11), 1046–1050. <https://doi.org/10.1139/w00-089>
- Ainsworth, G. C., & Cowan, S. T. (1954). Rules of Nomenclature for Fungi and Bacteria. *Journal of General Microbiology*, 10(3), 465–474. <https://doi.org/10.1099/00221287-10-3-465>
- Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N., & Gírio, F. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(3), 965–972. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2409-6>
- Albertin, W., Chasseriaud, L., Comte, G., Panfili, A., Delcamp, A., Salin, F., Marullo, P., & Bely, M. (2014b). Winemaking and Bioprocesses Strongly Shaped the Genetic Diversity of the Ubiquitous Yeast *Torulaspora delbrueckii*. *PLOS ONE*, 9(4), e94246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094246>
- Albertin, W., Miot-Sertier, C., Bely, M., Marullo, P., Coulon, J., Moine, V., Colonna-Ceccaldi, B., & Masneuf-Pomarede, I. (2014c). Oenological prefermentation practices strongly impact yeast population dynamics and alcoholic fermentation kinetics in Chardonnay grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 178, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.009>
- Albertin, W., Panfili, A., Miot-Sertier, C., Goulielmakis, A., Delcamp, A., Salin, F., Lonvaud-Funel, A., Curtin, C., & Masneuf-Pomarede, I. (2014a). Development of microsatellite markers for the rapid and reliable genotyping of *Brettanomyces bruxellensis* at strain level. *Food Microbiology*, 42, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.012>
- Alexandre, H., Costello, P. J., Remize, F., Guzzo, J., & Guilloux-Benatier, M. (2004). *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* interactions in wine: Current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 93(2), 141–154.

<https://doi.org/10.1016/j.jjfoodmicro.2003.10.013>

- Alvarez-Ordóñez, A., Coughlan, L. M., Briandet, R., & Cotter, P. D. (2019). Biofilms in Food Processing Environments: Challenges and Opportunities. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10(1), 173–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121805>
- Ambroña, J., & Ramírez, M. (2007). Analysis of Homothallic *Saccharomyces cerevisiae* Strain Mating during Must Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2486–2490. <https://doi.org/10.1128/AEM.02431-06>
- Amoah-Buahin, E., Bone, N., & Armstrong, J. (2005). Hyphal Growth in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell*, 4(7), 1287–1297. <https://doi.org/10.1128/EC.4.7.1287-1297.2005>
- Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J. M., & Esteve-Zarzoso, B. (2010). Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *European Food Research and Technology*, 231(2), 215–224. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1272-0>
- Arroyo-López, F. N., Salvadó, Z., Tronchoni, J., Guillamón, J. M., Barrio, E., & Querol, A. (2010). Susceptibility and resistance to ethanol in *Saccharomyces* strains isolated from wild and fermentative environments. *Yeast*, 27(12), 1005–1015. <https://doi.org/10.1002/yea.1809>
- Avis, P. G., Dickie, I. A., & Mueller, G. M. (2006). A ‘dirty’ business: Testing the limitations of terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) analysis of soil fungi. *Molecular Ecology*, 15(3), 873–882. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02842.x>
- Avramova, M., Cibrario, A., Peltier, E., Coton, M., Coton, E., Schacherer, J., Spano, G., Capozzi, V., Blaiotta, G., Salin, F., Dols-Lafargue, M., Grbin, P., Curtin, C., Albertin, W., & Masneuf-Pomarede, I. (2018a). *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution. *Scientific Reports*, 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22580-7>
- Avramova, M., Vallet-Courbin, A., Maupeu, J., Masneuf-Pomarede, I., & Albertin, W. (2018b). Molecular Diagnosis of *Brettanomyces bruxellensis* Sulfur Dioxide Sensitivity Through Genotype Specific Method. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01260>
- Ayoub, M.-J., Legras, J.-L., Saliba, R., & Gaillardin, C. (2006). Application of Multi Locus Sequence Typing to the analysis of the biodiversity of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from Lebanon. *Journal of Applied Microbiology*, 100(4), 699–711. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02817.x>
- Azumi, M., & Goto-Yamamoto, N. (2001). AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application to phenetic clustering. *Yeast*, 18(12), 1145–1154. <https://doi.org/10.1002/yea.767>

- B**ackhus, L. E., DeRisi, J., & Bisson, L. F. (2001). Functional genomic analysis of a commercial wine strain of *Saccharomyces cerevisiae* under differing nitrogen conditions. *FEMS Yeast Research*, 1(2), 111–125. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2001.tb00022.x>
- Bae, S., Fleet, G. H., & Heard, G. M. (2006). Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *Journal of Applied Microbiology*, 100(4), 712–727. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02890.x>
- Bağder Elmaci, S., Gülgör, G., Tokatli, M., Erten, H., İsci, A., & Özçelik, F. (2015). Effectiveness of chitosan against wine-related microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 107(3), 675–686. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0362-6>
- Bagheri, B., Bauer, F. F., & Setati, M. E. (2017). The Impact of *Saccharomyces cerevisiae* on a Wine Yeast Consortium in Natural and Inoculated Fermentations. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01988>
- Balandreau, J. (2000). La diversité microbienne. *Aménagement et Nature*, 136, 9–24.
- Baleiras Couto, M. M., Reizinho, R. G., & Duarte, F. L. (2005). Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 102(1), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.01.005>
- Baleiras-Couto, M. M., & Eiras-Dias, J. E. (2006). Detection and identification of grape varieties in must and wine using nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Analytica Chimica Acta*, 563(1), 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.076>
- Barata, A., Caldeira, J., Botelho, R., Pagliara, D., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2008). Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.020>
- Barata, A., Laureano, P., D'Antuono, I., Martorell, P., Stender, H., Malfeito-Ferreira, M., Querol, A., & Loureiro, V. (2013). Enumeration and Identification of 4-Ethylphenol Producing Yeasts Recovered from the Wood of Wine Ageing Barriques after Different Sanitation Treatments. *Journal of Food Research*, 2(1), 140. <https://doi.org/10.5539/jfr.v2n1p140>
- Bartowsky, E. J., & Henschke, P. A. (2008). Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine—A review. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.016>
- Bataillon, M., Rico, A., Sablayrolles, J. M., Salmon, J. M., & Barre, P. (1996). Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: impact on alcoholic fermentation kinetics. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82, 145–150. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)85037-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)85037-9)
- Bau, M., Castellá, G., Bragulat, M. R., & Cabañes, F. J. (2006). RFLP characterization of

- Aspergillus niger* aggregate species from grapes from Europe and Israel. *International Journal of Food Microbiology*, 111, S18–S21.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.03.008>
- Belda, I., Zarraonaindia, I., Perisin, M., Palacios, A., & Acedo, A. (2017). From Vineyard Soil to Wine Fermentation: Microbiome Approximations to Explain the “terroir” Concept. *Frontiers in Microbiology*, 8, 821. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00821>
- Belin, J.-M. (1979). Contribution à l'étude des levures des chais- taxonomie, répartition des levures. *Mycopathologia*, 67(2), 67–81. <https://doi.org/10.1007/BF00440676>
- Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Rozès, N., & Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(2), 287–293.
<https://doi.org/10.1078/0723-2020-00097>
- Bevan, E. A., & Makover, M. (1963). The physiological basis of the killer character in yeasts. In *Genetics Today XI International Congress on Genetics* (Vol. 1). Geert SJ editor.
- Bidenne, C., Blondin, B., Dequin, S., & Vezinhet, F. (1992). Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 22(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/BF00351734>
- Bisson, L. F. (1999). Stuck and Sluggish Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 13.
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., & Visconti, A. (2006). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonariu* and *A.niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 204–209.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.004>
- Boekhout, T., Renting, M., Scheffers, W. A., & Bosboom, R. (1993). The use of karyotyping in the systematics of yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 63(2), 157–163.
- Bokulich, N. A., Hwang, C.-F., Liu, S., Boundy-Mills, K. L., & Mills, D. A. (2012a). Profiling the Yeast Communities of Wine Fermentations Using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63(2), 185–194. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.11077>
- Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M., & Mills, D. A. (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), E139–E148.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1317377110>
- Bokulich, Nicholas A., Collins, T. S., Masarweh, C., Allen, G., Heymann, H., Ebeler, S. E., & Mills, D. A. (2016). Associations among Wine Grape Microbiome, Metabolome, and Fermentation Behavior Suggest Microbial Contribution to Regional Wine Characteristics. *MBio*, 7(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00631-16>
- Bokulich, Nicholas A., Joseph, C. M. L., Allen, G., Benson, A. K., & Mills, D. A. (2012b).

- Next-Generation Sequencing Reveals Significant Bacterial Diversity of Botrytized Wine. *PLoS ONE*, 7(5), e36357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036357>
- Bokulich, Nicholas A., & Mills, D. A. (2013b). Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), 2519–2526. <https://doi.org/10.1128/AEM.03870-12>
- Bokulich, Nicholas A., Ohta, M., Richardson, P. M., & Mills, D. A. (2013a). Monitoring Seasonal Changes in Winery-Resident Microbiota. *PLoS ONE*, 8(6), e66437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066437>
- Bokulich, Nicholas A., Swadener, M., Sakamoto, K., Mills, D. A., & Bisson, L. F. (2015). Sulfur Dioxide Treatment Alters Wine Microbial Diversity and Fermentation Progression in a Dose-Dependent Fashion. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66(1), 73–79. <https://doi.org/10.5344/ajev.2014.14096>
- Bonaventura, G. D., Pompilio, A., Picciani, C., Iezzi, M., D'Antonio, D., & Piccolomini, R. (2006). Biofilm Formation by the Emerging Fungal Pathogen *Trichosporon asahii*: Development, Architecture, and Antifungal Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(10), 3269. <https://doi.org/10.1128/AAC.00556-06>
- Bouffaud, M.-L., Bernaud, E., Colombet, A., Van Tuinen, D., Wipf, D., & Redecker, D. (2016). Regional-scale analysis of arbuscular mycorrhizal fungi: The case of Burgundy vineyards. *OENO One*, 50(1), 1. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2016.50.1.49>
- Boynton, P. J., & Greig, D. (2016). Species richness influences wine ecosystem function through a dominant species. *Fungal Ecology*, 22, 61–72. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.04.008>
- Branco, P., Francisco, D., Chambon, C., Hébraud, M., Arneborg, N., Almeida, M. G., Caldeira, J., & Albergaria, H. (2014). Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 843–853. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5411-y>
- Brauer, M. J., Huttenhower, C., Airoidi, E. M., Rosenstein, R., Matese, J. C., Gresham, D., Boer, V. M., Troyanskaya, O. G., & Botstein, D. (2008). Coordination of Growth Rate, Cell Cycle, Stress Response, and Metabolic Activity in Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 19(1), 352–367. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-08-0779>
- Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27(4), 325–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>
- Briciu, D., Pamfil, D., Briciu, A., Curticiu, D., Balazs, E., Taoutaou, A., Pop, I., & Coța, L. (2010). Development of Methods for DNA Extraction from Leaves and Must Grapes. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies*, 67(1–2). <https://doi.org/10.15835/buasvmcn->

[asb:67:1-2:5369](#)

- Bridier, A., Sanchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J.-C., Naïtali, M., & Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 45(Pt B), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.015>
- Brilli, L., Buscioni, G., Moriondo, M., Bindi, M., & Vincenzini, M. (2014). Influence of Interannual Meteorological Variability on Yeast Content and Composition in Sangiovese Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*. <https://doi.org/10.5344/ajev.2014.13116>
- Broach, J. R. (2012). Nutritional Control of Growth and Development in Yeast. *Genetics*, 192(1), 73–105. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.135731>
- Brown, D. H., Giusani, A. D., Chen, X., & Kumamoto, C. A. (1999). Filamentous growth of *Candida albicans* in response to physical environmental cues and its regulation by the unique CZF1 gene. *Molecular Microbiology*, 34(4), 651–662. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01619.x>
- Bruyas, P. (2003). Area under vines in the EU down by 15.7% between 1989 and 1999. [<https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/971742b5-1a0f-4772-ba5a-345e41844619>].
- Burns, K. N., Kluepfel, D. A., Strauss, S. L., Bokulich, N. A., Cantu, D., & Steenwerth, K. L. (2015). Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: Differentiation by geographic features. *Soil Biology and Biochemistry*, 91, 232–247. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.09.002>
- Bussey, H. (1981). Physiology of killer factor in Yeast. In A. H. Rose (Ed.), *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press.
- C** Campanaro, S., Treu, L., Vendramin, V., Bovo, B., Giacomini, A., & Corich, V. (2014). Metagenomic analysis of the microbial community in fermented grape marc reveals that *Lactobacillus fabifermentans* is one of the dominant species: Insights into its genome structure. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), 6015–6037. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5795-3>
- Campisano, A., Antonielli, L., Pancher, M., Yousaf, S., Pindo, M., & Pertot, I. (2014). Bacterial endophytic communities in the grapevine depend on pest management. *PLoS ONE*, 9(11), e112763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112763>
- Canfora, L., Vendramin, E., Felici, B., Tarricone, L., Florio, A., & Benedetti, A. (2018). Vineyard microbiome variations during different fertilisation practices revealed by 16S rRNA gene sequencing. *Applied Soil Ecology*, 125, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.12.019>
- Capozzi, V., Di Toro, M. R., Grieco, F., Michelotti, V., Salma, M., Lamontanara, A., Russo, P., Orrù, L., Alexandre, H., & Spano, G. (2016). Viable But Not Culturable (VBNC) state of *Brettanomyces bruxellensis* in wine: New insights on molecular basis of

- VBNC behaviour using a transcriptomic approach. *Food Microbiology*, 59, 196–204.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.007>
- Cappello, M. S., Stefani, D., Grieco, F., Logrieco, A., & Zapparoli, G. (2008). Genotyping by Amplified Fragment Length Polymorphism and malate metabolism performances of indigenous *Oenococcus oeni* strains isolated from Primitivo wine. *International Journal of Food Microbiology*, 127(3), 241–245.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.009>
- Carle, G. F., & Olson, M. V. (1985). An electrophoretic karyotype for yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(11), 3756–3760.
- Carvalho-Netto, O. V., Carazzolle, M. F., Rodrigues, A., Bragança, W. O., Costa, G. G. L., Argueso, J. L., & Pereira, G. A. G. (2013). A simple and effective set of PCR-based molecular markers for the monitoring of the *Saccharomyces cerevisiae* cell population during bioethanol fermentation. *Journal of Biotechnology*, 168(4), 701–709.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.08.025>
- Castañeda, L. E., & Barbosa, O. (2017). Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil microbial communities in Chilean vineyards and surrounding native forests. *PeerJ*, 5, e3098. <https://doi.org/10.7717/peerj.3098>
- Chalutz, E., Ben-Arie, R., Droby, S., Cohen, L., Weiss, B., & Wilson, C. L. (1988). Yeasts as biocontrol agents of postharvest diseases of fruits. *Phytoparasitica : Israel Journal of Plant Protection Sciences*. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301406591>
- Charoenchai, C., Fleet, G. H., & Henschke, P. A. (1998). Effects of Temperature, pH, and Sugar Concentration on the Growth Rates and Cell Biomass of Wine Yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49(3), 283–288.
- Chatonnet, P. (2010). Nettoyage et désinfection appliqués aux contenants vinaires en bois destinés à la vinification et à l'élevage des vins (Partie II = Nécessité, Principes et Méthode de Désinfection du bois au contact du vin). *Revue des œnologues et des techniques vitivinicoles et œnologiques*, 137, 38–43.
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J., & Pons, M. (1992). The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740600205>
- Chen, H., & Fink, G. R. (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & Development*, 20(9), 1150–1161.
<https://doi.org/10.1101/gad.1411806>
- Cheraiti, N., Guezenc, S., & Salmon, J.-M. (2005). Redox interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in mixed culture under enological conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 255–260.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.255-260.2005>
- Chow, J., Dionne, H. M., Prabhakar, A., Mehrotra, A., Somboonthum, J., Gonzalez, B.,

- Edgerton, M., & Cullen, P. J. (2019). Aggregate Filamentous Growth Responses in Yeast. *MSphere*, 4(2), e00702-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00702-18>
- Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., & Romano, P. (2016). Yeast Interactions in Inoculated Wine Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00555>
- Ciani, M., Mannazzu, I., Marinangeli, P., Clementi, F., & Martini, A. (2004). Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85(2), 159–164. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020284.05802.d7>
- Cibrario, A. (2017). Diversité Génétique et Phénotypique de l'Espèce *Brettanomyces bruxellensis*. Influence sur son Potentiel d'Altération des Vins Rouges. Université de Bordeaux.
- Cibrario, A., Miot-Sertier, C., Paulin, M., Bullier, B., Riquier, L., Perello, M. C., de Revel, G., Albertin, W., Masneuf-Pomarède, I., Ballestra, P., & Dols-Lafargue, M. (2019a). *Brettanomyces bruxellensis* phenotypic diversity, tolerance to wine stress and wine spoilage ability. *Food Microbiology*, 103379. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103379>
- Cibrario, A., Sertier, C. M., Riquier, L., Revel, G. de, Masneuf-Pomarède, I., Ballestra, P., & Dols-Lafargue, M. (2019b). Cellar Temperature Affects *Brettanomyces bruxellensis* Population and Volatile Phenols Production in Bordeaux Aging Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, ajev.2019.19029. <https://doi.org/10.5344/ajev.2019.19029>
- Clavijo, A., Calderón, I. L., & Paneque, P. (2011b). Effect of the use of commercial *Saccharomyces* strains in a newly established winery in Ronda (Málaga, Spain). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99(3), 727–731. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9514-5>
- Clavijo, A., Calderón, I. L., & Paneque, P. (2011a). Yeast assessment during alcoholic fermentation inoculated with a natural “pied de cuve” or a commercial yeast strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(7), 1569–1577. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0609-y>
- Cocolin, L., Bisson, L. F., & Mills, D. A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, 189(1), 81–87. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09210.x>
- Cocolin, Luca, Heisey, A., & Mills, D. A. (2001). Direct Identification of the Indigenous Yeasts in Commercial Wine Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(1), 49–53.
- Cocolin, Luca, & Mills, D. A. (2003). Wine Yeast Inhibition by Sulfur Dioxide: A Comparison of Culture-Dependent and Independent Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(2), 125–130.

- Coenye, T., & Nelis, H. J. (2010). In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 83(2), 89–105. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.08.018>
- Comitini, F., & Ciani, M. (2010). The zymocidal activity of *Tetrapisispora phaffii* in the control of *Hanseniaspora uvarum* during the early stages of winemaking. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 50–56. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02754.x>
- Comitini, Francesca, De Ingeniis, J., Ingeniis De, J., Pepe, L., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2004). *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 238(1), 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.040>
- Connell, L., Stender, H., & Edwards, C. G. (2002). Rapid Detection and Identification of *Brettanomyces* from Winery Air Samples Based on Peptide Nucleic Acid Analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(4), 322–324.
- Constantí, M., Reguant, C., Poblet, M., Zamora, F., Mas, A., & Guillamón, J. M. (1998). Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 41(3), 169–175. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(98\)00041-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(98)00041-5)
- Constantí, Magda, Poblet, M., Arola, L., Mas, A., & Guillamón, J. M. (1997). Analysis of Yeast Populations During Alcoholic Fermentation in a Newly Established Winery. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(3), 339–344.
- Conterno, L., Joseph, C. M. L., Arvik, T. J., Henick-Kling, T., & Bisson, L. F. (2006). Genetic and Physiological Characterization of *Brettanomyces bruxellensis* Strains Isolated from Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(2), 139–147.
- Conway, M. K., Grunwald, D., & Heideman, W. (2012). Glucose, Nitrogen, and Phosphate Repletion in *Saccharomyces cerevisiae* : Common Transcriptional Responses to Different Nutrient Signals. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2(9), 1003–1017. <https://doi.org/10.1534/g3.112.002808>
- Correia, D. (2011). Le goût moisi-terreux du vin: Contribution à la caractérisation cinétique et métabolique des moisissures associées à ce défaut organoleptique. Université de Bourgogne.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., & Cheng, K.-J. (1978). How Bacteria Stick. *Scientific American*, 238(1), 86–95.
- Crabtree, H. G. (1929). Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochemical Journal*, 23(3), 536–545.
- Croxatto, A., Prod'hom, G., & Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 380–407. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>

- Cubaiu, L., Abbas, H., Dobson, A. D. W., Budroni, M., & Migheli, Q. (2012). A *Saccharomyces cerevisiae* wine strain inhibits growth and decreases Ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. *Toxins*, 4(12), 1468–1481. <https://doi.org/10.3390/toxins4121468>
- Cullen, P. J., & Sprague, G. F. (2000). Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13619–13624.
- Cullen, P. J., & Sprague, G. F. (2012). The Regulation of Filamentous Growth in Yeast. *Genetics*, 190(1), 23–49. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127456>
- Curtin, C. D., Bellon, J. R., Henschke, P. A., Godden, P. W., & de Barros Lopes, M. A. (2007). Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries. *FEMS Yeast Research*, 7(3), 471–481. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00183.x>
- Curtin, C. D., Borneman, A. R., Chambers, P. J., & Pretorius, I. S. (2012). De-novo assembly and analysis of the heterozygous triploid genome of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* AWRI1499. *PloS One*, 7(3), e33840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033840>
- Czekanowski, J. (1909). Zyr differential-diagnose der Neadertalgruppe. *Korrespondenz-Blatt Der Deutschen Gesellschaft Für Anthropologie Ethnologie Und Urgeschichte*, 40, 44–47.
- D**aran-Lapujade, P., Jansen, M. L. A., Daran, J.-M., van Gulik, W., de Winde, J. H., & Pronk, J. T. (2004). Role of transcriptional regulation in controlling fluxes in central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. A chemostat culture study. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 9125–9138. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309578200>
- David, V., Terrat, S., Herzine, K., Claisse, O., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Masneuf-Pomarede, I., Ranjard, L., & Alexandre, H. (2014). High-throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(5), 811–821. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1427-2>
- David-Vaizant, V., & Alexandre, H. (2018). Flor Yeast Diversity and Dynamics in Biologically Aged Wines. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02235>
- de Barros Lopes, M., Soden, A., Henschke, P. A., & Langridge, P. (1996). PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12), 4514–4520.
- De Deken, R. H. (1966). The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *Microbiology*, 44(2), 149–156. <https://doi.org/10.1099/00221287-44-2-149>

- De Filippis, F., La Stora, A., & Blaiotta, G. (2017). Monitoring the mycobiota during Greco di Tufo and Aglianico wine fermentation by 18S rRNA gene sequencing. *Food Microbiology*, *63*, 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.010>
- de Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, *23*(1), 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
- De Mandal, S., Panda, A. K., Bisht, S. S., & Kumar, N. S. (2015). Microbial Ecology in the Era of Next Generation Sequencing. *Journal of Next Generation Sequencing & Applications*, *01*(S1). <https://doi.org/10.4172/2469-9853.S1-001>
- Díaz, C., Badalyan, G., & Bücking, M. (2018). Molecular Techniques for the Detection and Identification of Yeasts in Wine. In *Molecular Techniques in Food Biology* (pp. 323–340). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119374633.ch14>
- Dickinson, J. R. (2008). Filament formation in *Saccharomyces cerevisiae* —A review. *Folia Microbiologica*, *53*(1), 3. <https://doi.org/10.1007/s12223-008-0001-6>
- Dicks, L. M. T., Todorov, S., & Endo, A. (2009). Microbial Interactions. In H. König, G. Uden, & J. Fröhlich (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 335–347). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0_18
- Diguta, C. F., Vincent, B., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H., & Rousseaux, S. (2011). PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. *Food Microbiology*, *28*(6), 1145–1154. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.03.006>
- Divol, B., & Lonvaud-Funel, A. (2005). Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *Journal of Applied Microbiology*, *99*(1), 85–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02578.x>
- du Toit, W. J., & Lambrechts, M. G. (2002). The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, *74*(1–2), 57–64. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00715-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00715-2)
- du Toit, W. J., Pretorius, I. S., & Lonvaud-Funel, A. (2005). The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, *98*(4), 862–871. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02549.x>
- Duarte, F. L., & Baleiras-Couto, M. (2012). Evaluation of fermenting grape must yeast dynamics by SSCP profiles. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, *27*(2), 95–101.
- Dubourdieu, D., Sokol, A., Zucca, J., Thalouran, P., Dattee, A., & Aigle, M. (1987). Identification des souches de levures isolées de vins par l'analyse de leur ADN mitochondrial. *Connaissance Vigne Vin*, *21*, 267–278.
- Duperoux, C. (2014). Le contrôle des *Brettanomyces* : Solutions pour la maîtrise hygiène vinaire. *Revue Française d'œnologie*, *265*, 16–18.

- E**cheverrigaray, S., Randon, M., da Silva, K., Zacaria, J., & Delamare, A. P. L. (2013). Identification and characterization of non-*Saccharomyces* spoilage yeasts isolated from Brazilian wines. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 29(6), 1019–1027. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1265-9>
- Egbuta, M. A., Mwanza, M., & Babalola, O. O. (2016). A Review of the Ubiquity of Ascomycetes Filamentous Fungi in Relation to Their Economic and Medical Importance. *Advances in Microbiology*, 6(14), 1140–1158. <https://doi.org/10.4236/aim.2016.614103>
- Egli, C. M., Edinger, W. D., Mitrakul, C. M., & Henick-Kling, T. (1998). Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *Journal of Applied Microbiology*, 85(5), 779–789.
- Eichmeier, A., Pečenka, J., Peňázová, E., Baránek, M., Català-García, S., León, M., Armengol, J., & Gramaje, D. (2018). High-throughput amplicon sequencing-based analysis of active fungal communities inhabiting grapevine after hot-water treatments reveals unexpectedly high fungal diversity. *Fungal Ecology*, 36, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.07.011>
- Enrique, M., Ibáñez, A., Marcos, J. F., Yuste, M., Martínez, M., Vallés, S., & Manzanares, P. (2010). Beta-Glucanases as a tool for the control of wine spoilage yeasts. *Journal of Food Science*, 75(1), M41-45. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01448.x>
- Erasmus, D. J., van der Merwe, G. K., & van Vuuren, H. J. J. (2003). Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. *FEMS Yeast Research*, 3(4), 375–399. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00203-9](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00203-9)
- Esposito, R. E., & Klapholz, S. (1981). Meiosis and ascospore development. In J. N. Strathern, E. W. Jones, & J. R. Broach (Eds.), *Molecular biology of the yeast saccharomyces, life cycle and inheritance*. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300346227>
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., & Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49 Pt 1, 329–337. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-329>
- Eurostat. (2015). *Vineyards in the EU - statistics*. 1–14.
- F**aist, H., Keller, A., Hentschel, U., & Deeken, R. (2016). Grapevine (*Vitis vinifera*) Crown Galls Host Distinct Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(18), 5542–5552. <https://doi.org/10.1128/AEM.01131-16>
- Fanning, S., & Mitchell, A. P. (2012). Fungal Biofilms. *PLOS Pathogens*, 8(4), e1002585. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002585>

- Fedurco, M., Romieu, A., Williams, S., Lawrence, I., & Turcatti, G. (2006). BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Research*, 34(3), e22. <https://doi.org/10.1093/nar/gnj023>
- Fellgett, P. B. (1951). *Theory of Infra-Red Sensitivities and its Application to Investigations of Stellar Radiation in the Near Infra-Red*. University of Cambridge.
- Fernández de Ullivarri, M., Mendoza, L. M., & Raya, R. R. (2014). Killer yeasts as biocontrol agents of spoilage yeasts and bacteria isolated from wine. *BIO Web of Conferences*, 3, 02001. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20140302001>
- Fidalgo, M., Barrales, R. R., Ibeas, J. I., & Jimenez, J. (2006). Adaptive evolution by mutations in the *FLO11* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11228–11233. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601713103>
- Field, D., & Wills, C. (1998). Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(4), 1647–1652. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1647>
- Finkel, J. S., & Mitchell, A. P. (2011). Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews. Microbiology*, 9(2), 109. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2475>
- Fischer, S. G., & Lerman, L. S. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(6), 1579–1583.
- Fisher, M. M., & Triplett, E. W. (1999). Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4630–4636.
- Fisher, R. A., Corbet, A. S., & Williams, C. B. (1943). The Relation Between the Number of Species and the Number of Individuals in a Random Sample of an Animal Population. *Journal of Animal Ecology*, 12(1), 42–58. JSTOR. <https://doi.org/10.2307/1411>
- Flannigan, B. (2001). Microorganisms in indoor air. In R. A. Samson, J. D. Miller, & B. Flannigan (Eds.), *Microorganisms in home and indoor work environments: Diversity, health impacts, investigation and control*.
- Fleet, G. H., & Heard, G. M. (1993). Yeast-growth during fermentation. In Graham H. Fleet (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. CRC Press.
- Fleet, G.H, Prakitchaiwattana, C. J., Beh, A. L., & Heard, G. M. (2002). The yeast ecology of wine grapes. In M. Ciani (Ed.), *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts*. Research Signpost.

- Flemming, H.-C. (2016). EPS-Then and Now. *Microorganisms*, 4(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms4040041>
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Frezier, V., & Dubourdieu, D. (1992). Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43(4), 375–380.
- Fritsche, W. (1972). The Yeasts, Vol. 2. Physiology and Biochemistry of Yeasts. *Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie*, 12(4), 349–349. <https://doi.org/10.1002/jobm.19720120411>
- Fugelsang, K. C., & Edwards, C. G. (2007). *Wine microbiology* (2nd ed). Springer.
- G**alafassi, S., Toscano, M., Vigentini, I., Zambelli, P., Simonetti, P., Foschino, R., & Compagno, C. (2015). Cold exposure affects carbohydrates and lipid metabolism, and induces Hog1p phosphorylation in *Dekkera bruxellensis* strain CBS 2499. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(5), 1145–1153. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0406-6>
- García-Sánchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J.-M., & d'Enfert, C. (2004). *Candida albicans* Biofilms: A Developmental State Associated With Specific and Stable Gene Expression Patterns. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 536. <https://doi.org/10.1128/EC.3.2.536-545.2004>
- Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Sanz, S., Olarte, C., & Gutiérrez, A. R. (2008). The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 141–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.014>
- Gaultier-Gaillard, S., & Pratlong, F. (2011). L'intégration de la biodiversité. In B. Moncef, V. Carbone, & M. Soulerot (Eds.), *Le management durable au cœur des organisations* (Lavoisier, p. 184).
- Gerbaux, V., Jeudy, S., & Monamy, C. (2000). Étude des phénols volatils dans les vins de Pinot noir en Bourgogne. *Bulletin de l'OIV (France)*, 73, 581–599.
- Ghosh, S., Bagheri, B., Morgan, H. H., Divol, B., & Setati, M. E. (2015). Assessment of wine microbial diversity using ARISA and cultivation-based methods. *Annals of Microbiology*, 65(4), 1833–1840. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-1021-x>
- Gimeno, C. J., Ljungdahl, P. O., Styles, C. A., & Fink, G. R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: Regulation by starvation and RAS. *Cell*, 68(6), 1077–1090. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90079-r](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90079-r)
- Gindreau, E., Walling, E., & Lonvaud-Funel, A. (2001). Direct polymerase chain reaction detection of ropy *Pediococcus damnosus* strains in wine. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 535–542. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01277.x>

- Giusani, A. D., Vinces, M., & Kumamoto, C. A. (2002). Invasive Filamentous Growth of *Candida albicans* Is Promoted by Czf1p-Dependent Relief of Efg1p-Mediated Repression. *Genetics*, 160(4), 1749–1753.
- Gobert, A., Tourdot-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Liu, Y., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., & Alexandre, H. (2017). Non-*Saccharomyces* Yeasts Nitrogen Source Preferences: Impact on Sequential Fermentation and Wine Volatile Compounds Profile. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2175. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02175>
- Goddard, M. R., Anfang, N., Tang, R., Gardner, R. C., & Jun, C. (2010). A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: Evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *Environmental Microbiology*, 12(1), 63–73. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02035.x>
- Gómez-Rivas, L., Escudero-Abarca, B. I., Aguilar-Uscanga, M. G., Hayward-Jones, P. M., Mendoza, P., & Ramírez, M. (2004). Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 31(1), 16–22. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0112-2>
- González, Á., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2005). Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *International Journal of Food Microbiology*, 102(3), 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.020>
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2004). Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 853–860.
- González-Arenzana, L., Santamaría, P., López, R., Garijo, P., Gutiérrez, A. R., Garde-Cerdán, T., & López-Alfaro, I. (2013). Microwave technology as a new tool to improve microbiological control of oak barrels: A preliminary study. *Food Control*, 30(2), 536–539. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.08.008>
- Granchi, L., Bosco, M., Messini, A., & Vincenzini, M. (1999). Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR–RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Journal of Applied Microbiology*, 87(6), 949–956. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00600.x>
- Grangeteau, C., Gerhards, D., Terrat, S., Dequiedt, S., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., von Wallbrunn, C., & Rousseaux, S. (2016b). FT-IR spectroscopy: A powerful tool for studying the inter- and intraspecific biodiversity of cultivable non-*Saccharomyces* yeasts isolated from grape must. *Journal of Microbiological Methods*, 121, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.12.009>
- Grangeteau, C., Gerhards, D., von Wallbrunn, C., Alexandre, H., Rousseaux, S., & Guilloux-Benatier, M. (2016a). Persistence of Two Non-*Saccharomyces* Yeasts (*Hanseniaspora* and *Starmerella*) in the Cellar. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00268>

- Grangeteau, C., Roullier-Gall, C., Rousseaux, S., Gougeon, R. D., Schmitt-Kopplin, P., Alexandre, H., & Guilloux-Benatier, M. (2017). Wine microbiology is driven by vineyard and winery anthropogenic factors. *Microbial Biotechnology*, *10*(2), 354–370. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12428>
- Gray, J. V., Petsko, G. A., Johnston, G. C., Ringe, D., Singer, R. A., & Werner-Washburne, M. (2004). “Sleeping beauty”: Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *68*(2), 187–206. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.187-206.2004>
- Gregory, P. H. (1971). Airborne microbes: Their significance and distribution. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *177*(1049), 469–483. <https://doi.org/10.1098/rspb.1971.0043>
- Grube, M., Schmid, F., & Berg, G. (2011). Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. *Fungal Biology*, *115*(10), 978–986. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.04.004>
- Guillamón, J. M., Barrio, E., & Querol, A. (1996). Characterization of Wine Yeast Strains of the *Saccharomyces* Genus on the Basis of Molecular Markers: Relationships Between Genetic Distance and Geographic or Ecological Origin. *Systematic and Applied Microbiology*, *19*(1), 122–132. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(96\)80019-1](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(96)80019-1)
- Guillamón, J. M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., & Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*, *169*(5), 387–392. <https://doi.org/10.1007/s002030050587>
- Guilloux-Benatier, M., Chassagne, D., Alexandre, H., Charpentier, C., & Feuillat, M. (2001). Influence de l'autolyse des levures après fermentation sur le développement de *Brettanomyces/Dekkera* dans le vin. *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin*, *35*(3), 157–164. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2001.35.3.1701>
- Gutiérrez, C., Gómez-Flechoso, M. Á., Belda, I., Ruiz, J., Kayali, N., Polo, L., & Santos, A. (2017). Wine yeasts identification by MALDI-TOF MS: Optimization of the preanalytical steps and development of an extensible open-source platform for processing and analysis of an in-house MS database. *International Journal of Food Microbiology*, *254*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.003>
- Guzzon, R., Bernard, M., Barnaba, C., Bertoldi, D., Pixner, K., & Larcher, R. (2017). The impact of different barrel sanitation approaches on the spoilage microflora and phenols composition of wine. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(3), 810–821. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2527-6>
- Guzzon, R., Widmann, G., Malacarne, M., Nardin, T., Nicolini, G., & Larcher, R. (2011). Survey of the yeast population inside wine barrels and the effects of certain techniques in preventing microbiological spoilage. *European Food Research and Technology*, *233*(2), 285–291. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1523-8>
- Gweon, H. S., Oliver, A., Taylor, J., Booth, T., Gibbs, M., Read, D. S., Griffiths, R. I., &

Schonrogge, K. (2015). PIPITS: An automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(8), 973–980. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12399>

Hheard, G. M., & Fleet, G. H. (1986). Evaluation of selective media for enumeration of yeasts during wine fermentation. *Journal of Applied Bacteriology*, 60(6), 477–481. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1986.tb01086.x>

Heard, Gillian M., & Fleet, G. H. (1985). Growth of Natural Yeast Flora during the Fermentation of Inoculated Wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(3), 727–728.

Hellborg, L., & Piškur, J. (2009). Complex Nature of the Genome in a Wine Spoilage Yeast, *Dekkera bruxellensis*. *Eukaryotic Cell*, 8(11), 1739–1749. <https://doi.org/10.1128/EC.00115-09>

Hennequin, C., Thierry, A., Richard, G. F., Lecointre, G., Nguyen, H. V., Gaillardin, C., & Dujon, B. (2001). Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), 551–559. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.551-559.2001>

Henschke, P. A., & Jiranek, V. (1993). Yeasts-metabolism of nitrogen compounds. In Graham H. Fleet (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology* (pp. 77–164). CRC Press.

Hierro, N., González, Á., Mas, A., & Guillamón, J. m. (2004). New PCR-based methods for yeast identification. *Journal of Applied Microbiology*, 97(4), 792–801. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02369.x>

Hierro, Núria, Esteve-Zarzoso, B., González, A., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2006). Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7148–7155. <https://doi.org/10.1128/AEM.00388-06>

Hodel, R. G. J., Segovia-Salcedo, M. C., Landis, J. B., Crowl, A. A., Sun, M., Liu, X., Gitzendanner, M. A., Douglas, N. A., Germain-Aubrey, C. C., Chen, S., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2016). The report of my death was an exaggeration: A review for researchers using microsatellites in the 21st century. *Applications in Plant Sciences*, 4(6), 1600025. <https://doi.org/10.3732/apps.1600025>

Holland, R. D., Wilkes, J. G., Rafii, F., Sutherland, J. B., Persons, C. C., Voorhees, K. J., & Lay, J. O. (1996). Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 10(10), 1227–1232.

Hong, S., Bunge, J., Leslin, C., Jeon, S., & Epstein, S. S. (2009). Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity. *The ISME Journal*, 3(12), 1365–1373. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.89>

Howell, K. S., Bartowsky, E. J., Fleet, G. H., & Henschke, P. A. (2004). Microsatellite PCR profiling of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, 38(4), 315–320.

Hranilovic, A., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Jiranek, V., & Albertin, W. (2017). The evolution of *Lachancea thermotolerans* is driven by geographical determination, anthropisation and flux between different ecosystems. *PLOS ONE*, 12(9), e0184652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184652>

Hunter, M. L. (2002). *Fundamentals of Conservation Biology*. Blackwell Science.

Ibeas, J. I., Lozano, I., Perdignes, F., & Jimenez, J. (1996). Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), 998–1003.

Işçi, B., Yildirim, H. K., & Altindisli, A. (2014). Evaluation of methods for DNA extraction from must and wine. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(3), 238–243. <https://doi.org/10.1002/jib.129>

Ivey, M. L., & Phister, T. G. (2011). Detection and identification of microorganisms in wine: A review of molecular techniques. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(10), 1619–1634. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1020-x>

Jaccard, P. (1912). The distribution of the flora in the alpine zone.1. *New Phytologist*, 11(2), 37–50. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1912.tb05611.x>

Jiranek, V., Langridge, P., & Henschke, P. A. (1995). Amino Acid and Ammonium Utilization by *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts From a Chemically Defined Medium. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(1), 75–83.

Jiranek, Vladimir, Grbin, P., Yap, A., Barnes, M., & Bates, D. (2008). High power ultrasonics as a novel tool offering new opportunities for managing wine microbiology. *Biotechnology Letters*, 30(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9518-z>

Joseph, C. M. L., Kumar, G., Su, E., & Bisson, L. F. (2007). Adhesion and Biofilm Production by Wine Isolates of *Brettanomyces bruxellensis*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(3), 373–378.

Julien, A., Roustan, J.-L., Dulau, L., & Sablayrolles, J.-M. (2000). Comparison of Nitrogen and Oxygen Demands of Enological Yeasts: Technological Consequences. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(3), 215–222.

Jurasinski, G., Retzer, V., & Beierkuhnlein, C. (2009). Inventory, differentiation, and proportional diversity: A consistent terminology for quantifying species diversity. *Oecologia*, 159(1), 15–26. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1190-z>

- K**ántor, A., & Kacaniova, M. M. (2015). Diversity of bacteria and yeasts on the surface of table grapes. *Animal Science and Biotechnologies*, 48, 149–155.
- Kapetanakou, A. E., Kollias, J. N., Drosinos, E. H., & Skandamis, P. N. (2012). Inhibition of *A. carbonarius* growth and reduction of ochratoxin A by bacteria and yeast composites of technological importance in culture media and beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 152(3), 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.010>
- Karabulut, O. A., Smilanick, J. L., Gabler, F. M., Mansour, M., & Droby, S. (2003). Near-Harvest Applications of *Metschnikowia fructicola*, Ethanol, and Sodium Bicarbonate to Control Postharvest Diseases of Grape in Central California. *Plant Disease*, 87(11), 1384–1389. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.11.1384>
- Kecskeméti, E., Berkelmann-Löhnertz, B., & Reineke, A. (2016). Are Epiphytic Microbial Communities in the Carposphere of Ripening Grape Clusters (*Vitis vinifera* L.) Different between Conventional, Organic, and Biodynamic Grapes? *PLOS ONE*, 11(8), e0160852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160852>
- Kemsawasd, V., Branco, P., Almeida, M. G., Caldeira, J., Albergaria, H., & Arneborg, N. (2015). Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachancea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 362(14). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv103>
- Kim, J. M., Vanguri, S., Boeke, J. D., Gabriel, A., & Voytas, D. F. (1998). Transposable elements and genome organization: A comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Research*, 8(5), 464–478. <https://doi.org/10.1101/gr.8.5.464>
- Kioroglou, D., LLeixá, J., Mas, A., & Portillo, M. D. C. (2018). Massive Sequencing: A New Tool for the Control of Alcoholic Fermentation in Wine? *Fermentation*, 4(1), 7. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010007>
- Kish, S., Sharf, R., & Margalith, P. (1983). A note on a selective medium for wine yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, 55(1), 177–179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02663.x>
- Kizis, D., Natskoulis, P., Nychas, G.-J. E., & Panagou, E. Z. (2014). Biodiversity and ITS-RFLP Characterisation of *Aspergillus Section Nigri* Isolates in Grapes from Four Traditional Grape-Producing Areas in Greece. *PLOS ONE*, 9(4), e93923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093923>
- Knight, S. J., & Goddard, M. R. (2016). Sporulation in soil as an overwinter survival strategy in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 16(1). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov102>
- Knight, S., Klaere, S., Fedrizzi, B., & Goddard, M. R. (2015). Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: Evidence for a microbial aspect to terroir. *Scientific Reports*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/srep14233>

- Kõljalg, U., Larsson, K.-H., Abarenkov, K., Nilsson, R. H., Alexander, I. J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjølner, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A. F. S., Tedersoo, L., & Vrålstad, T. (2005). UNITE: A database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 166(3), 1063–1068. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01376.x>
- König, H., Uden, G., & Fröhlich, J. (Eds.). (2017). *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Springer Berlin Heidelberg.
- Kreader, C. A. (1996). Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), 1102–1106.
- Krebs, C. J. (1989). *Ecological methodology*. Harper & Row.
- Kregiel, D., James, S. A., Rygala, A., Berłowska, J., Antolak, H., & Pawlikowska, E. (2018). Consortia formed by yeasts and acetic acid bacteria *Asaia* spp. in soft drinks. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(3), 373–383. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0959-7>
- Kulski, J. K. (2016). Next-Generation Sequencing—An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*. <https://doi.org/10.5772/61964>
- Kuthan, M., Devaux, F., Janderová, B., Slaninová, I., Jacq, C., & Palková, Z. (2003). Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Molecular Microbiology*, 47(3), 745–754. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03332.x>
- L**afon-Lafourcade, S. (1984). Souches de levures. *Bulletin de l'OIV*, 637, 185–203.
- Lasa, I. (2006). Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 9(1), 21–28.
- Le Jeune, C., Erny, C., Demuyter, C., & Lollier, M. (2006). Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiology*, 23(8), 709–716. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.02.007>
- Lee, C. K., Herbold, C. W., Polson, S. W., Wommack, K. E., Williamson, S. J., McDonald, I. R., & Cary, S. C. (2012). Groundtruthing next-gen sequencing for microbial ecology—biases and errors in community structure estimates from PCR amplicon pyrosequencing. *PloS One*, 7(9), e44224. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044224>
- Legras, J.-L., & Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters*, 221(2), 249–255. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00205-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00205-2)
- Leriche, V., Sibille, P., & Carpentier, B. (2000). Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay

- to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1851–1856.
<https://doi.org/10.1128/aem.66.5.1851-1856.2000>
- Leveau, J. H. J., & Tech, J. J. (2011). Grapevine microbiomics: Bacterial diversity on grape leaves and berries revealed by high-throughput sequence analysis of 16s rRNA amplicons. *Acta Horticulturae*, 905, 31–42.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.905.2>
- Lewis, R. W., LeTourneau, M. K., Davenport, J. R., & Sullivan, T. S. (2018). ‘Concord’ grapevine nutritional status and chlorosis rank associated with fungal and bacterial root zone microbiomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 129, 429–436.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.06.011>
- Li, J., Hu, W.-Z., & Xu, Y.-P. (2019). Diversity and Dynamics of Yeasts During Vidal Blanc Icewine Fermentation: A Strategy of the Combination of Culture-Dependent and High-Throughput Sequencing Approaches. *Frontiers in Microbiology*, 10.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01588>
- Lieckfeldt, E., Meyer, W., & Börner, T. (1993). Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology*, 33(6), 413–425.
- Lin, X., & Heitman, J. (2005). Chlamyospore Formation during Hyphal Growth in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 4(10), 1746–1754.
<https://doi.org/10.1128/EC.4.10.1746-1754.2005>
- Lisanti, M. T., Blaiotta, G., Nioi, C., & Moio, L. (2019). Alternative Methods to SO₂ for Microbiological Stabilization of Wine. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(2), 455–479. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12422>
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H., & Forney, L. J. (1997). Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4516–4522.
- Liu, Y., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R., Sadoudi, M., Gougeon, R., Schmitt-Kopplin, P., & Alexandre, H. (2017). Wine microbiome: A dynamic world of microbial interactions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(4), 856–873.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2014.983591>
- Lodhi, M. A., Ye, G.-N., Weeden, N. F., & Reisch, B. I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12(1), 6–13. <https://doi.org/10.1007/BF02668658>
- 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 Research International*, 89, 620–630.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.019>
- Lopandic, K., Gangl, H., Wallner, E., Tscheik, G., Leitner, G., Querol, A., Borth, N.,

- Breitenbach, M., Prillinger, H., & Tiefenbrunner, W. (2007). Genetically different wine yeasts isolated from Austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *FEMS Yeast Research*, 7(6), 953–965. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00240.x>
- Louw, M., Toit, M. du, Alexandre, H., & Divol, B. (2016). Comparative morphological characteristics of three *Brettanomyces bruxellensis* wine strains in the presence/absence of sulfur dioxide. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.040>
- Luo, C., Tsementzi, D., Kyrpides, N., Read, T., & Konstantinidis, K. T. (2012). Direct Comparisons of Illumina vs. Roche 454 Sequencing Technologies on the Same Microbial Community DNA Sample. *PLOS ONE*, 7(2), e30087. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030087>
- M**Maio, S. D., Polizzotto, G., Gangi, E. D., Foresta, G., Genna, G., Verzera, A., Scacco, A., Amore, G., & Oliva, D. (2012). Biodiversity of Indigenous *Saccharomyces* Populations from Old Wineries of South-Eastern Sicily (Italy): Preservation and Economic Potential. *PLOS ONE*, 7(2), e30428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030428>
- Malacrinò, P., Zapparoli, G., Torriani, S., & Dellaglio, F. (2001). Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, 45(2), 127–134. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(01\)00243-3](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(01)00243-3)
- Manginot, C., Roustan, J. L., & Sablayrolles, J. M. (1998). Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enzyme and Microbial Technology*, 23(7), 511–517. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00080-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00080-5)
- Margalef, D. (1951). Diversidad de especies en les comunideades natural. *Public Institutte of Biologic Barcelona*, 9, 5–27.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y.-J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., Jando, S.C., Alenquer, M.L.I., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.-B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., Rothberg, J.M., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Alenquer, M.L.I., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J.-B., Knight, J.R., Lanza, J.R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Lohman, K.L., Lu, H., Makhijani, V.B., McDade, K.E., McKenna, M.P., Myers, E.W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, M.T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Volkmer, G.A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Begley, R.F., Rothberg, J. M.

- (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376–380. <https://doi.org/10.1038/nature03959>
- Marinangeli, P., Angelozzi, D., Ciani, M., Clementi, F., & Mannazzu, I. (2004). Minisatellites in genes encoding cell wall proteins: a new way towards wine strain characterization. *FEMS Yeast Research*, 4(4-5), 427–435. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00172-7](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00172-7)
- Martin, S. W., Douglas, L. M., & Konopka, J. B. (2005). Cell cycle dynamics and Quorum Sensing in *Candida albicans* chlamydozoospores are distinct from budding and hyphal growth. *Eukaryotic Cell*, 4(7), 1191–1202. <https://doi.org/10.1128/EC.4.7.1191-1202.2005>
- Martinez, L. R., & Casadevall, A. (2007). *Cryptococcus neoformans* Biofilm Formation Depends on Surface Support and Carbon Source and Reduces Fungal Cell Susceptibility to Heat, Cold, and UV Light. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4592. <https://doi.org/10.1128/AEM.02506-06>
- Martínez-Culebras, P. V., & Ramón, D. (2007). An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 113(2), 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.023>
- Martiniuk, J. T., Pacheco, B., Russell, G., Tong, S., Backstrom, I., & Measday, V. (2016). Impact of Commercial Strain Use on *Saccharomyces cerevisiae* Population Structure and Dynamics in Pinot Noir Vineyards and Spontaneous Fermentations of a Canadian Winery. *PLoS ONE*, 11(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160259>
- Martins, G., Lauga, B., Miot-Sertier, C., Mercier, A., Lonvaud, A., Soulas, M.-L., Soulas, G., & Masneuf-Pomarède, I. (2013). Characterization of Epiphytic Bacterial Communities from Grapes, Leaves, Bark and Soil of Grapevine Plants Grown, and Their Relations. *PLoS ONE*, 8(8), e73013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073013>
- Martins, G., Vallance, J., Mercier, A., Albertin, W., Stamatopoulos, P., Rey, P., Lonvaud, A., & Masneuf-Pomarède, I. (2014). Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.002>
- Martorell, P., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Fernández-Espinar, M. T., Loureiro, V., & Querol, A. (2006). Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1), 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.014>
- Marzano, M., Fosso, B., Manzari, C., Grieco, F., Intranuovo, M., Cozzi, G., Mulè, G., Scioscia, G., Valiente, G., Tullo, A., Sbisà, E., Pesole, G., & Santamaria, M. (2016). Complexity and Dynamics of the Winemaking Bacterial Communities in Berries, Musts, and Wines from Apulian Grape Cultivars through Time and Space. *PLoS ONE*, 11(6), e0157383. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157383>

- Masneuf-Pomarede, I., Juquin, E., Miot-Sertier, C., Renault, P., Laizet, Y., Salin, F., Alexandre, H., Capozzi, V., Cocolin, L., Colonna-Ceccaldi, B., Englezos, V., Girard, P., Gonzalez, B., Lucas, P., Mas, A., Nisiotou, A., Sipiczki, M., Spano, G., Tassou, C., Bely, M., & Albertin, W. (2015). The yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) shows high genetic diversity in winemaking environments. *FEMS Yeast Research*, 15(5), fov045. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov045>
- Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., & Flemming, H. C. (1999). The role of intermolecular interactions: Studies on model systems for bacterial biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26(1), 3–16.
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2012). Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.012>
- Mercado, L., Dalcero, A., Masuelli, R., & Combina, M. (2007). Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology*, 24(4), 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.06.005>
- Millet, V., & Lonvaud-Funel, A. (2000). The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology*, 30(2), 136–141.
- Moreno, C., Zuria, I., García-Zenteno, M., Sánchez-Rojas, G., Castellanos, I., Martínez-Morales, M., & Rojas-Martínez, A. (2006). Trends in the measurement of alpha diversity in the last two decades. *Interciencia*, 31(1), 67–71.
- Møretrø, T., & Langsrud, S. (2017). Residential Bacteria on Surfaces in the Food Industry and Their Implications for Food Safety and Quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1022–1041. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12283>
- Morgan, H. H., du Toit, M., & Setati, M. E. (2017). The Grapevine and Wine Microbiome: Insights from High-Throughput Amplicon Sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00820>
- Morrison-Whittle, P., & Goddard, M. R. (2018). From vineyard to winery: A source map of microbial diversity driving wine fermentation. *Environmental Microbiology*, 20(1), 75–84. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13960>
- Morrison-Whittle, P., Lee, S. A., & Goddard, M. R. (2017). Fungal communities are differentially affected by conventional and biodynamic agricultural management approaches in vineyard ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 246, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.05.022>
- Mortimer, R., & Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*, 150(3), 199–204.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific

enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, 263–273.

Murat, M. L., & Dumeau, F. (2003). Impact of fining on population levels of certain spoilage micro-organisms in red wines. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 92–94.

Murillo, L. A., Newport, G., Lan, C.-Y., Habelitz, S., Dungan, J., & Agabian, N. M. (2005). Genome-Wide Transcription Profiling of the Early Phase of Biofilm Formation by *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 4(9), 1562. <https://doi.org/10.1128/EC.4.9.1562-1573.2005>

Myers, R. M., Fischer, S. G., Lerman, L. S., & Maniatis, T. (1985). Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 13(9), 3131–3145.

Nadai, C., Treu, L., Campanaro, S., Giacomini, A., & Corich, V. (2016). Different mechanisms of resistance modulate sulfite tolerance in wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(2), 797–813. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7169-x>

Nagahama, T. (2006). Yeast Biodiversity in Freshwater, Marine and Deep-Sea Environments. In G. Péter & C. Rosa (Eds.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp. 241–262). Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_12

Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H., & Giesbrecht, P. (1991). The characterization of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). In W. H. Nelson (Ed.), *Modern techniques for rapid microbiological analysis*. VCH.

Neiman, A. M. (2011). Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 189(3), 737–765. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127126>

Ness, F., Lavallée, F., Dubourdieu, D., Aigle, M., & Dulau, L. (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62(1), 89–94. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740620113>

Nisiotou, A. A., Spiropoulos, A. E., & Nychas, G.-J. E. (2007). Yeast Community Structures and Dynamics in Healthy and Botrytis-Affected Grape Must Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 6705–6713. <https://doi.org/10.1128/AEM.01279-07>

Ocón, E., Garijo, P., Sanz, S., Olarte, C., López, R., Santamaría, P., & Gutiérrez, A. R. (2013). Analysis of airborne yeast in one winery over a period of one year. *Food Control*, 30(2), 585–589. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.051>

Ocón, E., Gutiérrez, A. R., Garijo, P., López, R., & Santamaría, P. (2010). Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. *Food*

- Microbiology*, 27(8), 1023–1027. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.06.012>
- Ocón, E., Gutiérrez, A. R., Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Olarte, C., & Sanz, S. (2011). Factors of Influence in the Distribution of Mold in the Air in a Wine Cellar. *Journal of Food Science*, 76(3), M169–M174. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02097.x>
- Ocón, Elena, Gutiérrez, A. R., Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Olarte, C., & Sanz, S. (2014). Influence of Winery Age and Design on the Distribution of Airborne Molds in Three Rioja Wine Cellars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 65(4), 479–485. <https://doi.org/10.5344/ajev.2014.14009>
- O’Connell, H. A., Kottkamp, G. S., Eppelbaum, J. L., Stubblefield, B. A., Gilbert, S. E., & Gilbert, E. S. (2006). Influences of biofilm structure and antibiotic resistance mechanisms on indirect pathogenicity in a model polymicrobial biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 5013–5019. <https://doi.org/10.1128/AEM.02474-05>
- Odum, E. P. (1959). *Fundamentals of Ecology*. Saunders.
- Oelofse, A., Malherbe, S., Pretorius, I. S., & Du Toit, M. (2010). Preliminary evaluation of infrared spectroscopy for the differentiation of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.004>
- Ohkuni, K., Hayashi, M., & Yamashita, I. (1998). Bicarbonate-mediated social communication stimulates meiosis and sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 14(7), 623–631.
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 43 Spec No, 93–100.
- Oro, L., Ciani, M., & Comitini, F. (2014). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 116(5), 1209–1217. <https://doi.org/10.1111/jam.12446>
- Oro, L., Canonico, L., Marinelli, V., Ciani, M., & Comitini, F. (2019). Occurrence of *Brettanomyces bruxellensis* on Grape Berries and in Related Winemaking Cellar. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00415>
- Ough, C. S., Davenport, M., & Joseph, K. (1989). Effects of certain vitamins on growth and fermentation rate of several commercial active dry wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40(3), 208–213.
- P**alková, Z., Janderová, B., Gabriel, J., Zikánová, B., Pospíšek, M., & Forstová, J. (1997). Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature*, 390(6659), 532–536. <https://doi.org/10.1038/37398>
- Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P. E., Longa, C. M. O., Yousaf, S., Pertot, I., & Campisano,

- A. (2012). Fungal Endophytic Communities in Grapevines (*Vitis vinifera* L.) Respond to Crop Management. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4308–4317. <https://doi.org/10.1128/AEM.07655-11>
- Paterson, R. R. M., Venâncio, A., Lima, N., Guilloux-Bénatier, M., & Rousseaux, S. (2018). Predominant mycotoxins, mycotoxigenic fungi and climate change related to wine. *Food Research International*, 103, 478–491. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.080>
- Perazzolli, M., Antonielli, L., Storari, M., Puopolo, G., Pancher, M., Giovannini, O., Pindo, M., & Pertot, I. (2014). Resilience of the natural phyllosphere microbiota of the grapevine to chemical and biological pesticides. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(12), 3585–3596. <https://doi.org/10.1128/AEM.00415-14>
- Pereira, L., Guedes-Pinto, H., & Martins-Lopes, P. (2011). An Enhanced Method for *Vitis vinifera* L. DNA Extraction from Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(4), 547–552. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.10022>
- Pérez, F., Ramírez, M., & Regodón, J. A. (2001). Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79(3), 393–399. <https://doi.org/10.1023/A:1012034608908>
- Pérez, M. A., Gallego, F.J., Martínez, I., & Hidalgo, P. (2001). Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Letters in Applied Microbiology*, 33(6), 461–466. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.01032.x>
- Pérez-Martín, F., Seseña, S., Fernández-González, M., Arévalo, M., & Palop, M. L. (2014). Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. *International Journal of Food Microbiology*, 190, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.020>
- Pérez-Navado, F., Albergaria, H., Hogg, T., & Girio, F. (2006). Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), 336–345. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.012>
- Perpetuini, G., Tittarelli, F., Schirone, M., Di Gianvito, P., Corsetti, A., Arfelli, G., Suzzi, G., & Tofalo, R. (2018). Adhesion properties and surface hydrophobicity of *Pichia manshurica* strains isolated from organic wines. *LWT*, 87, 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.011>
- Peynaud, E., & Domercq, S. (1959). A Review of Microbiological Problems in Wine-Making in France. *American Journal of Enology and Viticulture*, 10(2), 69–77.
- Piao, H., Hawley, E., Kopf, S., DeScenzo, R., Sealock, S., Henick-Kling, T., & Hess, M. (2015). Insights into the bacterial community and its temporal succession during the fermentation of wine grapes. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00809>
- Picco, A. M., & Rodolfi, M. (2004). Assessments of Indoor Fungi in Selected Wineries of

- Oltrepo Pavese (Northern Italy) and Sottoceneri (Switzerland). *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(4), 355–362.
- Pinto, C., Pinho, D., Cardoso, R., Custódio, V., Fernandes, J., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., & Gomes, A. C. (2015). Wine fermentation microbiome: A landscape from different Portuguese wine appellations. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00905>
- Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., & C. Gomes, A. (2014). Unravelling the Diversity of Grapevine Microbiome. *PLoS ONE*, 9(1), e85622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085622>
- Pinu, F. R., Edwards, P. J. B., Gardner, R. C., & Villas-Boas, S. G. (2014). Nitrogen and carbon assimilation by *Saccharomyces cerevisiae* during Sauvignon blanc juice fermentation. *FEMS Yeast Research*, 14(8), 1206–1222. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12222>
- Pommier, S., Strehaiano, P., & Délia, M. L. (2005). Modelling the growth dynamics of interacting mixed cultures: A case of amensalism. *International Journal of Food Microbiology*, 100(1), 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.010>
- Ponsone, M. L., Chiotta, M. L., Combina, M., Dalcero, A., & Chulze, S. (2011). Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus section Nigri* in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 151(1), 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.005>
- Porebski, S., Bailey, L. G., & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15(1), 8–15. <https://doi.org/10.1007/BF02772108>
- Portillo, M. del C., Franquès, J., Araque, I., Reguant, C., & Bordons, A. (2016). Bacterial diversity of Grenache and Carignan grape surface from different vineyards at Priorat wine region (Catalonia, Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 219, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.002>
- Portillo, M. del C., & Mas, A. (2016). Analysis of microbial diversity and dynamics during wine fermentation of Grenache grape variety by high-throughput barcoding sequencing. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 317–321. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.009>
- Poupault, P. (2015). Caractérisation des phénomènes de bio-adhésion à l'origine des altérations des vins. *Vigne et Vin Publications Internationales (Ed), CEno2015*, 234–237.
- Prakitchaiwattana, C. J., Fleet, G. H., & Heard, G. M. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Research*, 4(8), 865–877. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.05.004>
- Pramateftaki, P. V., Lanaridis, P., & Typas, M. A. (2000). Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: A case study with strains from two vine-growing areas

- of Greece. *Journal of Applied Microbiology*, 89(2), 236–248.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01102.x>
- Pu, L., Jingfan, F., Kai, C., Chao-an, L., & Yunjiang, C. (2014). Phenylethanol promotes adhesion and biofilm formation of the antagonistic yeast *Kloeckera apiculata* for the control of blue mold on citrus. *FEMS Yeast Research*, 14(4), 536–546.
<https://doi.org/10.1111/1567-1364.12139>
- Q**uerol, A., Barrio, E., Huerta, T., & Ramón, D. (1992). Molecular Monitoring of Wine Fermentations Conducted by Active Dry Yeast Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 2948–2953.
- Querol, A., Fernández-Espinar, M. T., del Olmo, M. Í, & Barrio, E. (2003). Adaptive evolution of wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1–2), 3–10.
[https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00244-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00244-7)
- R**amírez, M., Pérez, F., & Regodón, J. A. (1998). A Simple and Reliable Method for Hybridization of Homothallic Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 5039–5041.
- Ramírez, M., Velázquez, R., Maqueda, M., López-Piñeiro, A., & Ribas, J. C. (2015). A new wine *Torulaspora delbrueckii* killer strain with broad antifungal activity and its toxin-encoding double-stranded RNA virus. *Frontiers in Microbiology*, 6.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00983>
- Ramírez-Castrillón, M., Mendes, S. D. C., Inostroza-Ponta, M., & Valente, P. (2014). (GTG)₅ MSP-PCR Fingerprinting as a Technique for Discrimination of Wine Associated Yeasts? *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105870>
- Raspor, P., Cus, F., Povhe Jemec, K., Zagorc, T., Cadez, N., & Nemanic, J. (2002). Yeast Population Dynamics in Spontaneous and Inoculated Alcoholic Fermentations of Zametovka Must. *Food Technology and Biotechnology*, 40(2), 95–102.
- Renouf, V., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2007). Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(1), 149–164.
<https://doi.org/10.1007/s00253-006-0798-3>
- Ribéreau-Gayon, P. (1985). New Developments In Wine Microbiology. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36(1), 1–10.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of enology* (2nd ed). John Wiley.
- Richard, N., Serpaggi, V., & Massini, L. (2014). Comparaison de procédés de nettoyage des barriques: Bilan de quatre années d'expérimentations. *Revue des œnologues et des techniques vitivinicoles et œnologiques*, 41(151), 25–27.

- Richard, P., Bakker, B. M., Teusink, B., Van Dam, K., & Westerhoff, H. V. (1996). Acetaldehyde mediates the synchronization of sustained glycolytic oscillations in populations of yeast cells. *European Journal of Biochemistry*, 235(1–2), 238–241. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.00238.x>
- Roberts, R. L., & Fink, G. R. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: Mating and invasive growth. *Genes & Development*, 8(24), 2974–2985. <https://doi.org/10.1101/gad.8.24.2974>
- Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., & Divol, B. (2018). Altered Fermentation Performances, Growth, and Metabolic Footprints Reveal Competition for Nutrients between Yeast Species Inoculated in Synthetic Grape Juice-Like Medium. *Frontiers in Microbiology*, 9, 196. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00196>
- Rousseaux, S., Diguta, C. F., Radoi-Matei, F., Alexandre, H., & Guilloux-Bénatier, M. (2014). Non-Botrytis grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off-flavors and mycotoxins. *Food Microbiology*, 38, 104–121. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.013>
- Rozpędowska, E., Hellborg, L., Ishchuk, O. P., Orhan, F., Galafassi, S., Merico, A., Woolfit, M., Compagno, C., & Piškur, J. (2011). Parallel evolution of the make–accumulate–consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nature Communications*, 2(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms1305>
- Rudi, K., Moen, B., Drømtoorp, S. M., & Holck, A. L. (2005). Use of Ethidium Monoazide and PCR in Combination for Quantification of Viable and Dead Cells in Complex Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 1018–1024. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.1018-1024.2005>
- S**abate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., & Guillamón, J. M. (2002). Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiological Research*, 157(4), 267–274. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00163>
- Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.-J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., & Alexandre, H. (2012). Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiology*, 32(2), 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.006>
- Salma, M. (2013). Etude et caractérisation de l'état 'Viable mais Non Cultivable' chez *Saccharomyces cerevisiae*. Université de Bourgogne.
- Salma, M., Rousseaux, S., Sequeira-Le Grand, A., Divol, B., & Alexandre, H. (2013). Characterization of the Viable but Nonculturable (VBNC) State in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS One*, 8(10), e77600. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077600>
- Salvadó, Z., Arroyo-López, F. N., Barrio, E., Querol, A., & Guillamón, J. M. (2011).

- Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28(6), 1155–1161. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.03.008>
- Salvetti, E., Campanaro, S., Campedelli, I., Fracchetti, F., Gobbi, A., Tornielli, G. B., Torriani, S., & Felis, G. E. (2016). Whole-Metagenome-Sequencing-Based Community Profiles of *Vitis vinifera* L. cv. Corvina Berries Withered in Two Post-harvest Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00937>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sangorrín, M. P., Lopes, C. A., Giraudo, M. R., & Caballero, A. C. (2007). Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. *International Journal of Food Microbiology*, 119(3), 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.010>
- Santamaría, P., Garijo, P., López, R., Tenorio, C., & Rosa Gutiérrez, A. (2005). Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: Effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *International Journal of Food Microbiology*, 103(1), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.024>
- Santamaría, P., López, R., López, E., Garijo, P., & Gutiérrez, A. R. (2008). Permanence of yeast inocula in the winery ecosystem and presence in spontaneous fermentations. *European Food Research and Technology*, 227(5), 1563–1567. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0855-5>
- Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E., & Marquina, D. (2009). PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 2), 624–634. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023663-0>
- Schade, B., Jansen, G., Whiteway, M., Entian, K. D., & Thomas, D. Y. (2004). Cold Adaptation in Budding Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 15(12), 5492–5502. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-03-0167>
- Schmid, Florian, Moser, G., Müller, H., & Berg, G. (2011). Functional and Structural Microbial Diversity in Organic and Conventional Viticulture: Organic Farming Benefits Natural Biocontrol Agents. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(6), 2188–2191. <https://doi.org/10.1128/AEM.02187-10>
- Schmid, Frank, Grbin, P., Yap, A., & Jiranek, V. (2011). Relative Efficacy of High-Pressure Hot Water and High-Power Ultrasonics for Wine Oak Barrel Sanitization. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(4), 519–526. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.11014>
- Schuller, D., Valero, E., Dequin, S., & Casal, M. (2004). Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiology Letters*, 231(1), 19–26.

- [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00928-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00928-5)
- Schütz, M., & Gafner, J. (1993). Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6), 551–558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb01594.x>
- Schwieger, F., & Tebbe, C. C. (1998). A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 4870–4876.
- 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*, 30(2), 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.020>
- Setati, Mathabatha E., Jacobson, D., & Bauer, F. F. (2015). Sequence-based Analysis of the *Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon Grape Must Mycobiome in Three South African Vineyards Employing Distinct Agronomic Systems. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01358>
- Setati, Mathabatha Evodia, Jacobson, D., Andong, U.-C., & Bauer, F. (2012). The Vineyard Yeast Microbiome, a Mixed Model Microbial Map. *PLoS ONE*, 7(12), e52609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052609>
- Shannon, C., & Weaver, W. (1964). *The Mathematical Theory of Communication*.
- Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50(3), 205–221. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.05.001>
- Sharples, G. J., & Lloyd, R. G. (1990). A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6503–6508. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6503>
- Shimizu, K. (1993). Killer Yeasts. In Graham H. Fleet (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology* (pp. 243–264). CRC Press.
- Simeray, J., Mandin, D., & Chaumont, J.-P. (2000). Annual variations of airborne fungal propagules in two wine cellars in French Jura. *Cryptogamie Mycologie*, 21(3), 163–169. [https://doi.org/10.1016/S0181-1584\(00\)80001-9](https://doi.org/10.1016/S0181-1584(00)80001-9)
- Simeray, J., Mandin, D., Mercier, M., & Chaumont, J.-P. (2001). Survey of viable airborne fungal propagules in French wine cellars. *Aerobiologia*, 17(1), 19–24. <https://doi.org/10.1023/A:1007686116283>
- Simonin, S., Alexandre, H., Nikolantonaki, M., Coelho, C., & Tourdot-Maréchal, R. (2018). Inoculation of *Torulaspora delbrueckii* as a bio-protection agent in winemaking. *Food Research International*, 107, 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.034>
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature*, 163(4148), 688.

<https://doi.org/10.1038/163688a0>

- Sipiczki, M. (2006). *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6716–6724. <https://doi.org/10.1128/AEM.01275-06>
- Sipos, R., Székely, A. J., Palatinszky, M., Révész, S., Márialigeti, K., & Nikolausz, M. (2007). Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 60(2), 341–350. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00283.x>
- Smith, B. D., & Divol, B. (2016). *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages. *Food Microbiology*, 59, 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.008>
- Smith, F. B. (1942). Contributions to the Development of Soil Microbiology from the Southeastern United States. *Science*, 96(2483), 95–98.
- Soares-Santos, V., Pardo, I., & Ferrer, S. (2017). Cells-qPCR as a direct quantitative PCR method to avoid microbial DNA extractions in grape musts and wines. *International Journal of Food Microbiology*, 261, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.019>
- Soares-Santos, V., Pardo, I., & Ferrer, S. (2018). Improved detection and enumeration of yeasts in wine by Cells-qPCR. *LWT*, 90, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.007>
- Soergel, D. A. W., Dey, N., Knight, R., & Brenner, S. E. (2012). Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences. *The ISME Journal*, 6(7), 1440–1444. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.208>
- Sørensen, T. J. (1948). *A Method of Establishing Groups of Equal Amplitude in Plant Sociology Based on Similarity of Species Content and Its Application to Analyses of the Vegetation on Danish Commons*. I kommission hos E. Munksgaard.
- Spadaro, D., Patharajan, S., Lorè, A., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2012). Ochratoxigenic black species of *Aspergilli* in grape fruits of northern Italy identified by an improved PCR-RFLP procedure. *Toxins*, 4(2), 42–54. <https://doi.org/10.3390/toxins4020042>
- Staib, P., & Morschhäuser, J. (2007). Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* —An enigmatic developmental programme. *Mycoses*, 50(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2006.01308.x>
- Steenkamp, J., Wild, I., Lourens, A., & Helden, P. van. (1994). Improved Method for DNA Extraction From *Vitis vinifera*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45(1), 102–106.
- Stefanini, I., Albanese, D., Cavazza, A., Franciosi, E., De Filippo, C., Donati, C., & Cavalieri, D. (2016). Dynamic changes in microbiota and mycobiota during spontaneous ‘Vino Santo Trentino’ fermentation: Microbiota of Vino Santo. *Microbial Biotechnology*,

- 9(2), 195–208. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12337>
- Stefanini, I., Carlin, S., Tocci, N., Albanese, D., Donati, C., Franceschi, P., Paris, M., Zenato, A., Tempesta, S., Bronzato, A., Vrhovsek, U., Mattivi, F., & Cavalieri, D. (2017). Core Microbiota and Metabolome of *Vitis vinifera* L. cv. Corvina Grapes and Musts. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00457>
- Stefanini, I., & Cavalieri, D. (2018). Metagenomic Approaches to Investigate the Contribution of the Vineyard Environment to the Quality of Wine Fermentation: Potentials and Difficulties. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00991>
- Stellato, G., Filippis, F. D., Storia, A. L., & Ercolini, D. (2015). Coexistence of Lactic Acid Bacteria and Potential Spoilage Microbiota in a Dairy Processing Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(22), 7893–7904. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-15>
- Stern, M. J., Ames, G. F., Smith, N. H., Robinson, E. C., & Higgins, C. F. (1984). Repetitive extragenic palindromic sequences: A major component of the bacterial genome. *Cell*, 37(3), 1015–1026. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90436-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90436-7)
- Sternes, P. R., Lee, D., Kutyna, D. R., & Borneman, A. R. (2017). A combined meta-barcoding and shotgun metagenomic analysis of spontaneous wine fermentation. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/098061>
- Storgårds, E., Tapani, K., Hartwall, P., Saleva, R., & Suihko, M.-L. (2006). Microbial Attachment and Biofilm Formation in Brewery Bottling Plants. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 64(1), 8–15. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-64-0008>
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J. A., Morata, A., & Calderón, F. (2007). The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera* : A review. *Food Chemistry*, 102(1), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.030>
- Sun, Y., & Liu, Y. (2014). Investigating of yeast species in wine fermentation using terminal restriction fragment length polymorphism method. *Food Microbiology*, 38, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.001>
- Šuranská, H., Vránová, D., & Omelková, J. (2016). Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.010>
- Suzzi, G., Romano, P., Ponti, I., & Montuschi, C. (1995, March 1). *Natural wine yeasts as biocontrol agents*. *Journal of Applied Bacteriology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb05030.x>
- Szabo, R. (1999). Dimorphism in *Yarrowia lipolytica* : Filament formation is suppressed by nitrogen starvation and inhibition of respiration. *Folia Microbiologica*, 44(1), 19–24. <https://doi.org/10.1007/BF02816215>

- T**aillandier, P., Lai, Q. P., Julien-Ortiz, A., & Brandam, C. (2014). Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: Influence of inoculation and nitrogen content. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 1959–1967.
- Takahashi, M., Ohta, T., Masaki, K., Mizuno, A., & Goto-Yamamoto, N. (2014). Evaluation of microbial diversity in sulfite-added and sulfite-free wine by culture-dependent and -independent methods. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(5), 569–575. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.10.012>
- Taylor, D. L., Walters, W. A., Lennon, N. J., Bochicchio, J., Krohn, A., Caporaso, J. G., & Pennanen, T. (2016). Accurate Estimation of Fungal Diversity and Abundance through Improved Lineage-Specific Primers Optimized for Illumina Amplicon Sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(24), 7217–7226. <https://doi.org/10.1128/AEM.02576-16>
- Taylor, M. W., Tsai, P., Anfang, N., Ross, H. A., & Goddard, M. R. (2014). Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. *Environmental Microbiology*, 16(9), 2848–2858. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12456>
- 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 Microbiology Ecology*, 94(2). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix188>
- Thomma, B. P. H. J. (2003). *Alternaria* spp.: From general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4(4), 225–236. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x>
- Thukral, A. K. (2017). A review on measurement of Alpha diversity in biology. *Agricultural Research Journal*, 54(1), 1. <https://doi.org/10.5958/2395-146X.2017.00001.1>
- Timke, M., Wang-Lieu, N. Q., Altendorf, K., & Lipski, A. (2008). Identity, beer spoiling and biofilm forming potential of yeasts from beer bottling plant associated biofilms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93(1–2), 151–161. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9189-8>
- Timke, M., Wolking, D., Wang-Lieu, N. Q., Altendorf, K., & Lipski, A. (2004). Microbial composition of biofilms in a brewery investigated by fatty acid analysis, fluorescence in situ hybridisation and isolation techniques. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(1), 100–107. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1601-y>
- Todd, B. E. N., Fleet, G. H., & Henschke, P. A. (2000). Promotion of Autolysis Through the Interaction of Killer and Sensitive Yeasts: Potential Application in Sparkling Wine Production. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(1), 65–72.
- Torija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 80(1), 47–53.

- Torriani, S., Zapparoli, G., & Suzzi, G. (1999). Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. *Antonie van Leeuwenhoek*, 75(3), 207–215. <https://doi.org/10.1023/A:1001773916407>
- Tra Bi, C. Y., N'guessan, F. K., Kouakou, C. A., Vignolles, N., Casaregola, S., & Djè, M. K. (2016). Identification of yeasts isolated from raffia wine (*Raphia hookeri*) produced in Cote d'Ivoire and genotyping of *Saccharomyces cerevisiae* strains by PCR inter-delta. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8), 125–134. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2095-3>
- Tristezza, M., Lourenço, A., Barata, A., Brito, L., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2010). Susceptibility of wine spoilage yeasts and bacteria in the planktonic state and in biofilms to disinfectants. *Annals of Microbiology*, 60(3), 549–556. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0085-5>
- Turcatti, G., Romieu, A., Fedurco, M., & Tairi, A.-P. (2008). A new class of cleavable fluorescent nucleotides: Synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. *Nucleic Acids Research*, 36(4), e25. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn021>
- U**rso, R., Rantsiou, K., Dolci, P., Rolle, L., Comi, G., & Cocolin, L. (2008). Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1053–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00364.x>
- Usbeck, J. C., Wilde, C., Bertrand, D., Behr, J., & Vogel, R. F. (2014). Wine yeast typing by MALDI-TOF MS. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), 3737–3752. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5586-x>
- V**alero, A., Sanchis, V., Ramos, A. J., & Marín, S. (2007). Studies on the interaction between grape-associated filamentous fungi on a synthetic medium. *International Journal of Food Microbiology*, 113(3), 271–276. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.001>
- Van vuuren, H. J. J., & Jacobs, C. J. (1992). Killer Yeasts in the Wine Industry: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43(2), 119–128.
- Vezeinhet, F., Blondin, B., & Hallet, J.-N. (1990). Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32(5), 568–571. <https://doi.org/10.1007/BF00173729>
- Vigentini, I., Joseph, C. M. L., Picozzi, C., Foschino, R., & Bisson, L. F. (2013). Assessment of the *Brettanomyces bruxellensis* metabolome during sulphur dioxide exposure. *FEMS Yeast Research*, 13(7), 597–608. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12060>

- Villalba, M. L., Susana Sáez, J., Del Monaco, S., Lopes, C. A., & Sangorrín, M. P. (2016). TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspota delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.006>
- Vincent, B. (2006). Dynamique des populations de *Brettanomyces* dans les vins de pinot noir de bourgogne en cours d'élevage: Effet souche et influence des traitements par le SO₂. *Revue Française d'oenologie*, 219, 1–6.
- Vitulo, N., Lemos, W. J. F. J., Calgaro, M., Confalone, M., Felis, G. E., Zapparoli, G., & Nardi, T. (2019). Bark and Grape Microbiome of *Vitis vinifera* : Influence of Geographic Patterns and Agronomic Management on Bacterial Diversity. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03203>
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., & Kuiper, M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407–4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- W**alsh, R. M., & Martin, P. A. (1977). Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in a Temperature Gradient Incubator. *Journal of the Institute of Brewing*, 83(3), 169–172. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1977.tb06813.x>
- Wang, C., García-Fernández, D., Mas, A., & Esteve-Zarzoso, B. (2015). Fungal diversity in grape must and wine fermentation assessed by massive sequencing, quantitative PCR and DGGE. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01156>
- Wei, Y.-J., Wu, Y., Yan, Y.-Z., Zou, W., Xue, J., Ma, W.-R., Wang, W., Tian, G., & Wang, L.-Y. (2018). High-throughput sequencing of microbial community diversity in soil, grapes, leaves, grape juice and wine of grapevine from China. *PLoS One*, 13(3), e0193097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193097>
- Wenning, M., Seiler, H., & Scherer, S. (2002). Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy, a Novel and Rapid Tool for Identification of Yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4717–4721. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4717-4721.2002>
- Werner, O., Ros, R. M., & Guerra, J. (2002). Direct amplification and NaOH extraction: Two rapid and simple methods for preparing bryophyte DNA for polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Bryology*, 24(2), 127–131. <https://doi.org/10.1179/037366802125000980>
- White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, F. J. R. M., White, T. J., Lee, S.-H., Taylor, L., & Shawe-Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: A guide to methods and applications. In *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications* (pp. 315–322).
- Whitesides, M. D., & Oliver, J. D. (1997). Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the Viable but Nonculturable State. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3), 1002–1005.

- Whittaker, R. H. (1972). Evolution and Measurement of Species Diversity. *Taxon*, 21(2/3), 213–251. <https://doi.org/10.2307/1218190>
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531–6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>
- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088–5090. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.11.5088>
- Wolska, K. I., Grudniak, A. M., Rudnicka, Z., & Markowska, K. (2016). Genetic control of bacterial biofilms. *Journal of Applied Genetics*, 57, 225. <https://doi.org/10.1007/s13353-015-0309-2>
- Woods, D. R., & Bevan, E. A. (1968). Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 51(1), 115–126. <https://doi.org/10.1099/00221287-51-1-115>
- Woods, D. R., Ross, I. W., & Hendry, D. A. (1974). A New Killer Factor Produced by a Killer/Sensitive Yeast Strain. *Microbiology*, 81(2), 285–289. <https://doi.org/10.1099/00221287-81-2-285>
- X**u, H. S., Roberts, N., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J., & Colwell, R. R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology*, 8(4), 313–323. <https://doi.org/10.1007/BF02010671>
- Xufre, A., Albergaria, H., Gírio, F., & Spencer-Martins, I. (2011). Use of interdelta polymorphisms of *Saccharomyces cerevisiae* strains to monitor population evolution during wine fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(1), 127–132. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0837-z>
- Xufre, A., Simões, F., Gírio, F., Clemente, A., & Amaral-Collaco, M. T. (2000). Use of RAPD Analysis for Differentiation among Six Enological *Saccharomyces* spp. Strains. *Food Technology and Biotechnology*, 38(1), 53–58.
- Y**amamoto, H. (2000). Viable but nonculturable state as a general phenomenon of non-sporeforming bacteria, and its modeling. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 6(2), 112–114. <https://doi.org/10.1007/PL00012149>
- Yap, A., Jiranek, V., Grbin, P., Barnes, M., & Bates, D. (2007). Studies on the application of high-power ultrasonics for barrel and plank cleaning and disinfection. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 22(3), 96–104.
- Young, T. W. (1987). Killer yeasts. In A. H. Rose & J. S. Harrison (Eds.), *The yeasts* (p. 131). Eds., Academic, New York.

Young, T. W., & Yagiu, M. (1978). A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 44(1), 59–77.
<https://doi.org/10.1007/bf00400077>

Zanol, G. C., Baleiras-Couto, M. M., & Duarte, F. L. (2010). Restriction profiles of 26S rDNA as a molecular approach for wine yeasts identification. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 25(2), 75–85.

Zara, G., Zara, S., Pinna, C., Marceddu, S., & Budroni, M. (2009). *FLO11* gene length and transcriptional level affect biofilm-forming ability of wild flor strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 12), 3838–3846.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.028738-0>

Zarnowski, R., Westler, W. M., Lacmbouh, G. A., Marita, J. M., Bothe, J. R., Bernhardt, J., Lounes-Hadj Saharaoui, A., Fontaine, J., Sanchez, H., Hatfield, R. D., Ntambi, J. M., Nett, J. E., Mitchell, A. P., & Andes, D. R. (2014). Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio*, 5(4), e01333-01314. <https://doi.org/10.1128/mBio.01333-14>

Zarraonaindia, I., Owens, S. M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., Bokulich, N. A., Mills, D. A., Martin, G., Taghavi, S., Lelie, D. van der, & Gilbert, J. A. (2015). The Soil Microbiome Influences Grapevine-Associated Microbiota. *MBio*, 6(2), e02527-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02527-14>

Zhang, J., Wang, E. T., Singh, R. P., Guo, C., Shang, Y., Chen, J., & Liu, C. (2018). Grape berry surface bacterial microbiome: Impact from the varieties and clones in the same vineyard from central China. *Journal of Applied Microbiology*, 126(1), 204–214.
<https://doi.org/10.1111/jam.14124>

Zimmermann, M., & Fournier, P. (1996). Electrophoretic Karyotyping of Yeasts. In K. Wolf (Ed.), *Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook* (pp. 101–116). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79856-6_3

ZoBell, C. E. (1946). *Marine microbiology, a monograph on hydrobacteriology*. Waltham, Mass., Chronica Botanica Company.
<http://archive.org/details/marinemicrobiolo00zobe>

Zuehlke, J. M., & Edwards, C. G. (2013). Impact of sulfur dioxide and temperature on culturability and viability of *Brettanomyces bruxellensis* in Wine. *Journal of Food Protection*, 76(12), 2024–2030. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-243R>

Zupan, J., Avbelj, M., Butinar, B., Kosel, J., Šergan, M., & Raspor, P. (2013). Monitoring of Quorum-Sensing Molecules during Minifermentation Studies in Wine Yeast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(10), 2496–2505.
<https://doi.org/10.1021/jf3051363>

Annexes



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicroNew advances on the *Brettanomyces bruxellensis* biofilm mode of life

Manon Lebleux^{a,1}, Hany Abdo^{a,1}, Christian Coelho^b, Louise Basmaciyani^a, Warren Albertin^c, Julie Maupeu^d, Julie Laurent^a, Chloé Roullier-Gall^a, Hervé Alexandre^a, Michèle Guilloux-Benatier^a, Stéphanie Weidmann^a, Sandrine Rousseaux^{a,*}

^a Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, Laboratoire VALMIS-IUVV, Dijon, France

^b Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, Laboratoire PCAV, Dijon, France

^c USC 1366 INRA, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Unité de Recherche Œnologie EA 4577, University of Bordeaux, Bordeaux, France

^d Microflora-ADERA, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Unité de Recherche Œnologie EA 4577, Bordeaux, France



ARTICLE INFO

Keywords:

Brettanomyces
Spoilage microorganism
Microcolonies
Chlamydospore
Wine

ABSTRACT

The wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis* can be found at several steps in the winemaking process due to its resistance to multiple stress conditions. The ability to form biofilm is a potential resistance strategy, although it has been given little attention so far for this yeast. In this work, the capacity to form biofilm and its structure were explored in YPD medium and in wine. Using microsatellite analysis, 65 isolates were discriminated into 5 different genetic groups from which 12 strains were selected. All 12 strains were able to form biofilm in YPD medium on a polystyrene surface. The presence of microcolonies, filamentous cells and extracellular polymeric substances, constituting the structure of the biofilm despite a small thickness, were highlighted using confocal and electronic microscopy. Moreover, different cell morphologies according to genetic groups were highlighted. The capacity to form biofilm in wine was also revealed for two selected strains. The impact of wine on biofilms was demonstrated with firstly considerable biofilm cell release and secondly growth of these released biofilm cells, both in a strain dependent manner. Finally, *B. bruxellensis* has been newly described as a producer of chlamydospore-like structures in wine, for both planktonic and biofilm lifestyles.

1. Introduction

Biofilms are complex associations of single- and multiple- species interconnected cells embedded in a hydrated self-produced matrix established at a solid/liquid or liquid/air interfaces (Alexandre, 2013; Costerton et al., 1995; Hall-Stoodley et al., 2004; Kolter and Greenberg, 2006). Biofilm development is a dynamic process including the key steps of the adhesion and maturation of microcolonies in a three-dimensional structure, and detachment during which cells acquire a particular phenotype (Flemming and Wingender, 2010; Sauer et al., 2002). Extracellular polymeric substances (EPS) produced throughout biofilm development are mainly composed of polysaccharides, proteins, extracellular DNA (eDNA) and lipids (Flemming, 2016; Jachlewski et al., 2015; Zarnowski et al., 2014) and can be present at various quantities dependent on environmental conditions, the age of the

biofilm and the type of microorganisms involved (Mayer et al., 1999). Biofilm mode of life allows microorganisms to better adapt to environmental conditions through metabolic cross-feeding, cell-cell interactions and especially chemical and physical resistance (Bastard et al., 2016; Davey and O'toole, 2000; O'Connell et al., 2006). This growth strategy, through surface colonization and the increase of stress resistance, contributes to the persistence of microorganisms in different environments, such as those encountered in the food industry (Coenye and Nelis, 2010; Møretro and Langsrud, 2017). In some cases, biofilms are used for increased microorganism performance, for example in the production of ethanol (Germec et al., 2016), their involvement in fermentation processes and persistence in the wine environment (Bastard et al., 2016; Tek et al., 2018). However, many studies have investigated the presence of biofilms, especially in the case of negative effects due to the risk of recurrent contamination of food and raw materials by

* Corresponding author.

E-mail addresses: Manon.Lebleux@u-bourgogne.fr (M. Lebleux), hany.abdo@u-bourgogne.fr (H. Abdo), christian.coelho@u-bourgogne.fr (C. Coelho), louise.basmaciyani@u-bourgogne.fr (L. Basmaciyani), warren.albertin@u-bordeaux.fr (W. Albertin), julie.maupeu@u-bordeaux.fr (J. Maupeu), julie.laurent@u-bourgogne.fr (J. Laurent), Chloe.Roullier-Gall@u-bourgogne.fr (C. Roullier-Gall), rvalex@u-bourgogne.fr (H. Alexandre), michele.guilloux-benatier@u-bourgogne.fr (M. Guilloux-Benatier), stephanie.weidmann@u-bourgogne.fr (S. Weidmann), sandrine.rousseau@u-bourgogne.fr (S. Rousseaux).

¹ Manon Lebleux and Hany Abdo contributed equally to this work

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108464>

Received 13 September 2019; Received in revised form 22 November 2019; Accepted 25 November 2019

Available online 28 November 2019

0168-1605/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

pathogenic or spoilage species (Alvarez-Ordóñez et al., 2019; Bridier et al., 2015). By studying biofilms present on the process surfaces of breweries, different spoilage microorganisms as *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida pelliculosa* were isolated (Timke et al., 2004, 2008).

In the wine industry, one of the most feared spoilage microorganisms is the yeast *Brettanomyces bruxellensis*. This yeast is responsible for the production of volatile phenols and most importantly 4-ethylphenol, which contributes to undesirable aromas described as “Brett character” (Chatonnet et al., 1992; Oelofse et al., 2008; Wedral et al., 2010), leading to rejection by consumers and to heavy economic losses (Fugelsang, 1997; Lattey et al., 2010). This yeast can be found at several steps in the winemaking process (Chatonnet et al., 1992; Renouf et al., 2006, 2009; Renouf and Lonvaud-Funel, 2007; Rubio et al., 2015; Suárez et al., 2007) due to its resistance to multiple stress conditions (Avramova et al., 2018b; Conterno et al., 2006; Longin et al., 2016; Schifferdecker et al., 2014; Serpaggi et al., 2012; Smith and Divol, 2016). The ability to form biofilm is another potential resistance strategy (Tek et al., 2018; Verstrepen and Klis, 2006), although in the case of *B. bruxellensis* it has been given only little attention so far. Up to now, few studies have demonstrated the capacity of several strains of *B. bruxellensis* to adhere on several surfaces (Ishchuk et al., 2016; Joseph et al., 2007; Kregiel et al., 2018; Poupault, 2015; Tristezza et al., 2010). Thus, Joseph et al. (2007) pinpointed for the first time the capacity of *B. bruxellensis* isolates to adhere and form a biofilm-like structure on polystyrene surfaces; also, the biofilm structures were not described. Moreover, the efficiency of adhesion and biofilm-like formation depend on the nutritional environment (Kregiel et al., 2018; Tristezza et al., 2010). Although these studies demonstrated the ability of *B. bruxellensis* to adhere and form a biofilm-like film, there is a lack of microscopic observations of these biofilm-like structures in synthetic media and in wine. Such observations would highlight the three-dimensional structure of the film and EPS production. Using confocal microscopy, Poupault (2015) was alone in describing different adhesion capacities with three-dimensional structures on polystyrene. Therefore, it seems necessary to deepen knowledge on the adhesive and biofilm formation capacities of *B. bruxellensis*, and to demonstrate its ability to form a biofilm (i.e. thickness, presence of microcolonies, EPS) on different surfaces in view to achieving better subsequent removal of this microbial species from winemaking material.

In this context, the purpose of our study was to: (i) investigate the kinetics of biofilm formation of *B. bruxellensis* strains; (ii) visualise the biofilm structure and morphology of cells by microscopic observations; and (iii) investigate the behaviours of biofilm in wine.

2. Material and methods

2.1. Yeast isolates

A total of 65 isolates belonging to the yeast *B. bruxellensis* were used in this study. These isolates were obtained from enological materials (i.e. from barrels, taps, pipes, transfer tanks) and/or wine from a winery. The yeasts were stored at -80°C in YPD liquid medium (0.5% w/v yeast extract (Biokar, Beauvais, France), 1% w/v bactopectone (Biokar), 2% w/v D-glucose (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) and 0.02% w/v chloramphenicol (Sigma, St Louis, USA)), containing 20% (v/v) glycerol.

2.2. Genotyping by microsatellite analysis

The DNA extraction of *B. bruxellensis* strains and PCR conditions for the microsatellite markers amplification and the amplicon analysis were performed according to Albertin et al., 2014 and Avramova et al., 2018a. Briefly, twelve microsatellite regions were amplified from the DNA of the 65 isolates, then fragment length was analyzed by capillary electrophoresis on an ABI 3130 XL sequencing machine (Albertin et al.,

2014). A number of repeated patterns for each microsatellite region analyzed were associated for each isolate. The diversity of the isolates studied was determined according to the variability of the number of repetitions.

To investigate the genetic relationships between strains, the microsatellite data-set was analyzed using the *Poppr* package in R. A dendrogram was established using Bruvo's distance and Neighbour Joining (NJ) clustering (Bruvo et al., 2004; Kamvar et al., 2014; Paradis et al., 2004). Bruvo's distance takes into account the mutational process of microsatellite loci and is well adapted to populations with mixed ploidy levels and is therefore, suitable for the study of the *B. bruxellensis* strain collection used in this work.

Clones were defined as isolates displaying the same genotype for all 12 microsatellite markers tested, allowing the generation of clonal groups.

2.3. Biofilm formation in YPD medium

2.3.1. YPD cultures

Using cultures stored at -80°C , starter cultures were prepared in triplicate in 5 mL of YPD medium at 28°C for 6 days. Then, the starter cultures were passed twice into fresh medium to obtain cultures in the same physiological state. Then, cell suspensions were readjusted at $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.05$ ($1 \text{ OD}_{600\text{nm}} = 1.0 \times 10^7 \text{ CFU/mL}$) in YPD medium to obtain the “YPD working culture”.

2.3.2. Biofilm formation on polystyrene plates

Twelve strains were selected from the 5 genetic groups, taking into account the distribution of the clonal groups. For each of the 12 strains selected, the biofilm formation on the polystyrene microplate was evaluated according to (Rieu et al., 2007) and adapted to the yeast. One mL of the “YPD working culture” was inoculated in 3 technical and 3 biological repetitions in a 24-well polystyrene plate from Costar® (Corning Incorporated, New-York, USA) at 28°C . After 48 h and 7, and 14 days (with medium turnover every 3.5 days), the wells were carefully washed twice with 500 μL of sterile physiological water (0.9% NaCl) to eliminate non-adhered cells. With the addition of 1 mL of sterile physiological water, the adhered cells were detached by strong pipetting with 15 backflows. The detached cells were estimated by numbering on YPD plates (YPD broth with 2% w/v agar) at 28°C after serial dilutions.

2.4. Biofilm formation in wine

2.4.1. Wine used

The wine used was elaborated from the Pinot Noir grape variety (Marsannay, 2018 vintage). This red wine was characterized by 11.20% (v/v) ethanol and a pH of 3.45. The wine was filtered and sterilized using a vacuum driven filtration system through a 0.22 μm sterile membrane (Stericup-GP, polyethersulfone, SCGPU05RE, Millipore Express® Plus Membrane).

2.4.2. Culture adaptation

Two different strains with significantly different number of adhered cells on polystyrene in YPD medium at 14 days (strains 11 and 14) were selected to study biofilm formation in wine. Before planktonic cell incubation in wine, the cells were adapted in wine as previously described (Longin et al., 2016). Using cultures stored at -80°C , starter cultures were prepared in triplicate in YPD medium at 28°C for 6 days. The cultures were therefore incubated in 10 mL of YPD medium supplemented with 5% (v/v) ethanol for 48 h. The $\text{OD}_{600\text{nm}}$ of each culture was adjusted to 0.1 into a 50:50 (v/v) wine:water solution. After wine adaptation, the cell concentration was readjusted to $5.0 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$ in the wine to obtain the “wine working culture”.

2.4.3. Biofilm formation on stainless steel chips in wine

The biofilm formation of *B. bruxellensis* in wine was studied on stainless steel chips using a protocol previously described (Bastard et al., 2016) and adapted to the yeasts. Briefly, stainless-steel chips (25 mm × 25 mm, Goodfellow, 316L, France) were immersed in 13 mL of the “wine working culture” described in paragraph 2.4.2. and incubated for at 28 °C. The yeast population was monitored on the chip (i.e. cells adhered and developed into biofilm): after 2, 24, 48 h, 7 and 14 days of incubation, the chips were collected and rinsed for 30 s in 13 mL of sterile physiological water to eliminate non-adhered cells on the chips. Afterwards, the chips were placed in new sterile physiological water (13 mL) and the cells were detached by sonication (3 min) (Bransonic CPXH1800H-E; Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, USA). For each time point, the cells detached from the chips were numbered by plating on YPD plates at 28 °C after serial dilutions. This experiment was performed in biological triplicates for each strain (i.e. 3 different “wine working cultures”).

2.4.4. Wine effect on 7 day-aged biofilms

For selected strains 11 and 14, the 7 day-aged biofilm formed on stainless-steel chips was obtained from the “YPD working culture” as previously described in paragraph 2.4.3. Then, the stainless-steel chips were placed in the sterile wine (13 mL) and the evolution of the yeast population on the chip (i.e. biofilm cells) and in the wine (i.e. planktonic cells, corresponding to cells released from biofilm over the time) was monitored. The 7 day-aged biofilm formed on stainless-steel chips was incubated at 28 °C for 2, 24, 48 h and 7 and 14 days and treated as described in paragraph 2.4.3. For each time point, the cells detached from the chips and the cells contained in the wine were numbered by plating on YPD plates at 28 °C after serial dilutions. This experiment was performed in biological triplicates for each strain (i.e. 3 different “YPD working cultures”).

2.5. Cell observations

2.5.1. Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

From the “YPD working culture”, 7 day-aged biofilms (with a medium turnover at 3.5 days) were formed in a 96-well polystyrene plate from Cellstar® (Greiner Bio-One International, Kremsmünster, Austria). After 7 days, each well was carefully washed with 100 µL of MacDlvaïne Buffer containing 2.83% w/v sodium phosphate dibasic (Sigma, St. Louis, USA), 2.10% w/v citric acid monohydrate (Sigma, St. Louis, USA) and adjusted at pH 4.0. Surface-associated cells were fluorescently tagged by adding 5(6)-Carboxyfluorescein Diacetate (CFDA) esterase activity marker (green; $\lambda_{ex} = 495 \text{ nm} / \lambda_{em} = 520 \text{ nm}$) at 7.5 µM (ThermoFisher, Illkrich, France) and the plate was placed in a dark place for 15 min.

The surface associated-cells were examined using a Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Germany) inverted confocal laser scanning microscope at the DImaCell Plateform (<http://dimacell.fr/index.php>). Observations were performed using a 40×/1.25 oil immersion objective lens. CLSM was equipped with a solid 488 nm diode (laser power: 3%) and the fluorescence emitted was recorded from 500 to 554 nm using a PMT detector with a gain of 790 V. The images were acquired by LAS X software (Leica Microsystems, Germany) at a resolution of 1024 × 1024 pixels, a scan speed of 400 Hz and a line average of 2. To assess the thickness of the structure and obtain 3D views, a series of optical sections at 1-µm intervals in the z-axis were taken throughout the full depth of the sample. The bright field channel was acquired simultaneously, using a second PMT detector. Subsequently, 3D reconstruction images of the biofilms were generated with LAS X software to obtain a top view for each strain.

ImageJ software was used to determine cell morphology and biofilm thickness from CLSM images. For the cell morphology, the length to width (l/w) ratio and cell area were determined from fifty measurements of single cells (Basmaciyen et al., 2018). For biofilm thickness, 5

random cuts following the z-axis were performed for each of the strains studied and 10 measurements were made per cut (total 50 measurements by strain).

2.5.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Biofilms were formed on stainless steel chips from the “YPD working culture” (for 7 days) and from “wine working culture” (for 7 and 14 days). The cells were fixed directly on the stainless-steel chips by a solution of 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer of pH 7.2 for 3 h at 4 °C. The samples were then washed with 0.05 mM phosphate buffer for 10 min at room temperature. Dehydration was performed by two successive immersions for 10 min in solutions of increasing ethanol content (30, 50, 70, 90, 100%). Then, each mixture was placed in a bath of ethanol-acetone solution (70:30, 50:50, 30:70, 100%) for 10 min. The chips were then air-dried and stored at room temperature. Afterwards, the samples were coated with a thin gold layer using an Edwards Scancoat Six Pirani 201 sputter coater (Edwards High Vacuum, Crawley, England) and then observed with a Hitachi SU1510 scanning electron microscope (Hitachi High-Technologies Corporation, Japan). SEM was performed at an accelerating voltage of 15 kV using a working distance between 7.5 mm and 9.7 mm.

2.5.3. Epifluorescence microscopy

Planktonic cells were incubated from the “wine working culture” at 28 °C for 14 days. The cells were adhered on a microscope fluorescence slide and then fixed in methanol at room temperature for 5 min. The fungal cell wall was stained using the Fungi-Fluor® kit (calcofluor) (Polysciences, Inc., Warrington, PA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, samples were incubated for 5 min with the reagent and washed once in Phosphate Buffer Saline 1× before adding a coverslide. The slides were examined with a BX51 epifluorescence microscope (Olympus, Rungis, France) coupled with the “CellF” software and using an “UPlanFL 40×” objective.

2.6. Statistical analyses

All the assays were performed in three biological replicates. The biomass and biofilm thickness data are expressed as means, assigned with the standard deviation. A one-way analysis of variance (ANOVA) with a post-hoc Tukey Honestly Significant Difference (HSD) test was used for statistical comparison. A *p*-value ≤ 0.05 was considered statistically significant. For cell morphology, the same test was used for the comparison of areas A, B and C with *p*-values ≤ 0.01.

3. Results

3.1. Biofilm structures

Sixty-five isolates of *B. bruxellensis* from enological materials (i.e. from barrels, taps, pipes, transfer tanks) and/or wine from a winery were discriminated by microsatellite analysis allowing their distribution in 5 of the 6 genetic groups (GG) described by Avramova et al., 2018a. The majority of isolates belong to GG3 and none belongs to the GG5 (Table 1). In all, 34 clonal groups were formed (each including isolates with a genetic distance equal to zero) (Table 1), allowing the selection of twelve strains distributed among the 5 genetic groups. Their ability to form biofilm in YPD medium was studied.

Biofilm formation kinetics was monitored in three independent biological replicates at 3 different time points: 48 h, 7 days and 14 days on polystyrene microplates for the 12 strains selected (Table 2). At 48 h, the different strains presented an average adhered population around 3.3×10^6 CFU/cm², except strains 11, 20, 60 and 63, which had a statistically lower population around 5.5×10^5 CFU/cm². At 7 days, the adhered population distribution ranged between 6.9×10^5 and 6.3×10^6 CFU/cm². Statistically, strains 2 and 65 had a larger adhered population compared to strains 7, 9, 11, 14, 20, 36 and 63. At 14 days,

Table 1
Distribution of the 65 isolates among 34 clonal groups in the 6 genetic groups (GG) described by Avramova et al., 2018a. None of the isolates belonged to the GG5.

Genetic groups	Clonal groups (isolates)					
GG1	1					
	14					
	25	27	49			
	26	30				
	61	62				
	GG2	2				
		4	6	11	17	19
		20				
		3	10			
	GG3	5	42			
		7	54	28		
		8				
9		44	55			
12						
13		15				
16						
18		38	46			
21		22	23	29	34	
24		37			35	
31						
32		52	53			
33						
36		40	43	64	47	
41					48	
45						
50						
51						
56						
57						
58						
59						
60						
GG5	-					
GG4	63					
GG6	65					

the populations of the 12 strains reached an average biomass of 4.1×10^6 CFU/cm². Strain 11 presented a significantly lower quantity of adhered cells compared to strains 7, 9, 14, 20, and 36 (Table 2).

Seven day-aged biofilms for the 12 strains were observed by CLSM to investigate biofilm characteristics (Fig. 1). CLSM observations showed cellular layers covering the entire surface for all the strains, except strain 63 which presented some uncovered areas. For this strain, the surface coverage seemed to be different with the development of microcolonies instead of cell layers spreading over the surface (Fig. 1A).

Biofilm thickness was determined for each strain. Average thickness

values were obtained from 50 measurements of random biofilm cuts of the representative views (Fig. 1A). An average thickness of 9.45 μ m was measured throughout the 12 strains. Taken together, these data suggest that all the strains tested were able to develop in contact with a surface. It is also noteworthy that the thickness of the biofilm appears to be related to cell size (Fig. 1A). Indeed, magnifications of the CLSM images performed for each strain allowed observing different cell shapes such as “round”, “lemon”, “rice grain” or “elongated” according to the strains (Fig. 1A, Table 3). In addition, filamentous cells were observed (Fig. 1B).

To better characterize these different cell shapes, the length to width ratio (l/w) and cell area were determined for 50 individual cells per strain (Basmacıyan et al., 2018). Each genetic group was characterized by its own cell measurements and cell shape (Table 3). The strains of GG1 were characterized by a “round” shape with an average cell area of 15.72 μ m² and average l/w ratio of 1.55, except strain 61 which presented a “rice grain” shape with atypical measurements of 12.75 μ m² and 1.91, respectively. The strains of GG2 with a “rice grain” shape were characterized by an average cell area of 11.36 μ m² and average l/w ratio of 1.91. The strains of GG3 were characterized by an “elongated” shape with an average cell area of 16.5 μ m² and an average l/w ratio of 2.53. Strain GG4 was characterized by a “lemon” shape with a cell area of 16.03 μ m² and a l/w ratio of 2.08. Finally, the “round” shaped cells of GG6 presented an average cell area of 16.57 μ m² and an average l/w ratio of 1.50. The distribution of the 12 strains according to cell area determined as a function of l/w ratio (Fig. 2), showed that the strains were statistically distributed in 3 different areas corresponding to morphological cell characteristics. GG3 and GG4 (area A) were grouped together as were GG6 and GG1 (area B), with the exception of strain 61. Indeed, this strain was statistically grouped with GG2 (area C). These results suggest a link between genetic groups and cell morphology.

Although CLSM provided an overview of the cells adhered on polystyrene, additional SEM observations were necessary to demonstrate and validate characteristic structures of biofilm development. Observations of strains 11 and 14 developed for 7 days on the stainless-steel chips in YPD medium (Fig. 3A) revealed the presence of microcolonies containing cells embedded in EPS and filamentous cells possibly playing a role in their cohesion.

3.2. *Brettanomyces* biofilm mode of life: what's up in wine?

The ability of the both strains (11 and 14) of *B. bruxellensis* were then investigated in wine to study (i) the development into biofilm in wine and (ii) the impact of wine on an established *B. bruxellensis* biofilm. These strains were chosen for their different ability to adhere on

Table 2

Biofilm growth of the 12 selected strains in YPD medium on polystyrene plates. Cultures were initially inoculated at 5.0×10^5 CFU/mL. The values represent the average of three independent biological replicates, assigned with standard deviation (gray values). Different letters represent significant difference (ANOVA, p-value ≤ 0.05) obtained between the 12 strains at each time point.

Strain	CFU/cm ²								
	48 h	7 days		14 days					
2	3.9×10^6	$\pm 2.68 \times 10^5$	a	6.1×10^6	$\pm 9.69 \times 10^5$	a	3.2×10^6	$\pm 1.88 \times 10^5$	ab
7	3.6×10^6	$\pm 5.53 \times 10^5$	a	2.5×10^6	$\pm 5.87 \times 10^5$	d	6.3×10^6	$\pm 1.16 \times 10^6$	a
9	3.1×10^6	$\pm 9.45 \times 10^5$	a	2.3×10^6	$\pm 1.54 \times 10^5$	d	4.7×10^6	$\pm 1.14 \times 10^6$	a
11	7.5×10^5	$\pm 2.15 \times 10^5$	bc	6.9×10^5	$\pm 5.11 \times 10^4$	e	2.4×10^6	$\pm 1.02 \times 10^6$	b
14	2.1×10^6	$\pm 1.47 \times 10^6$	ab	8.9×10^5	$\pm 1.62 \times 10^5$	e	5.3×10^6	$\pm 6.50 \times 10^5$	a
20	6.5×10^5	$\pm 9.99 \times 10^4$	c	2.8×10^6	$\pm 6.93 \times 10^5$	cd	5.4×10^6	$\pm 7.02 \times 10^5$	a
36	2.9×10^6	$\pm 6.93 \times 10^5$	a	3.3×10^6	$\pm 5.81 \times 10^5$	bcd	5.9×10^6	$\pm 2.57 \times 10^6$	a
49	4.6×10^6	$\pm 1.44 \times 10^6$	a	3.6×10^6	$\pm 2.92 \times 10^5$	abcd	3.3×10^6	$\pm 1.02 \times 10^6$	ab
60	6.6×10^5	$\pm 2.02 \times 10^5$	c	5.5×10^6	$\pm 1.41 \times 10^6$	ab	3.4×10^6	$\pm 7.47 \times 10^5$	ab
61	3.1×10^6	$\pm 7.36 \times 10^5$	a	4.5×10^6	$\pm 6.78 \times 10^5$	abc	3.2×10^6	$\pm 3.43 \times 10^5$	ab
63	1.5×10^5	$\pm 6.10 \times 10^4$	d	3.0×10^6	$\pm 8.87 \times 10^5$	cd	4.2×10^6	$\pm 5.62 \times 10^5$	ab
65	3.8×10^6	$\pm 1.35 \times 10^5$	a	6.3×10^6	$\pm 2.36 \times 10^5$	a	3.5×10^6	$\pm 6.44 \times 10^5$	ab

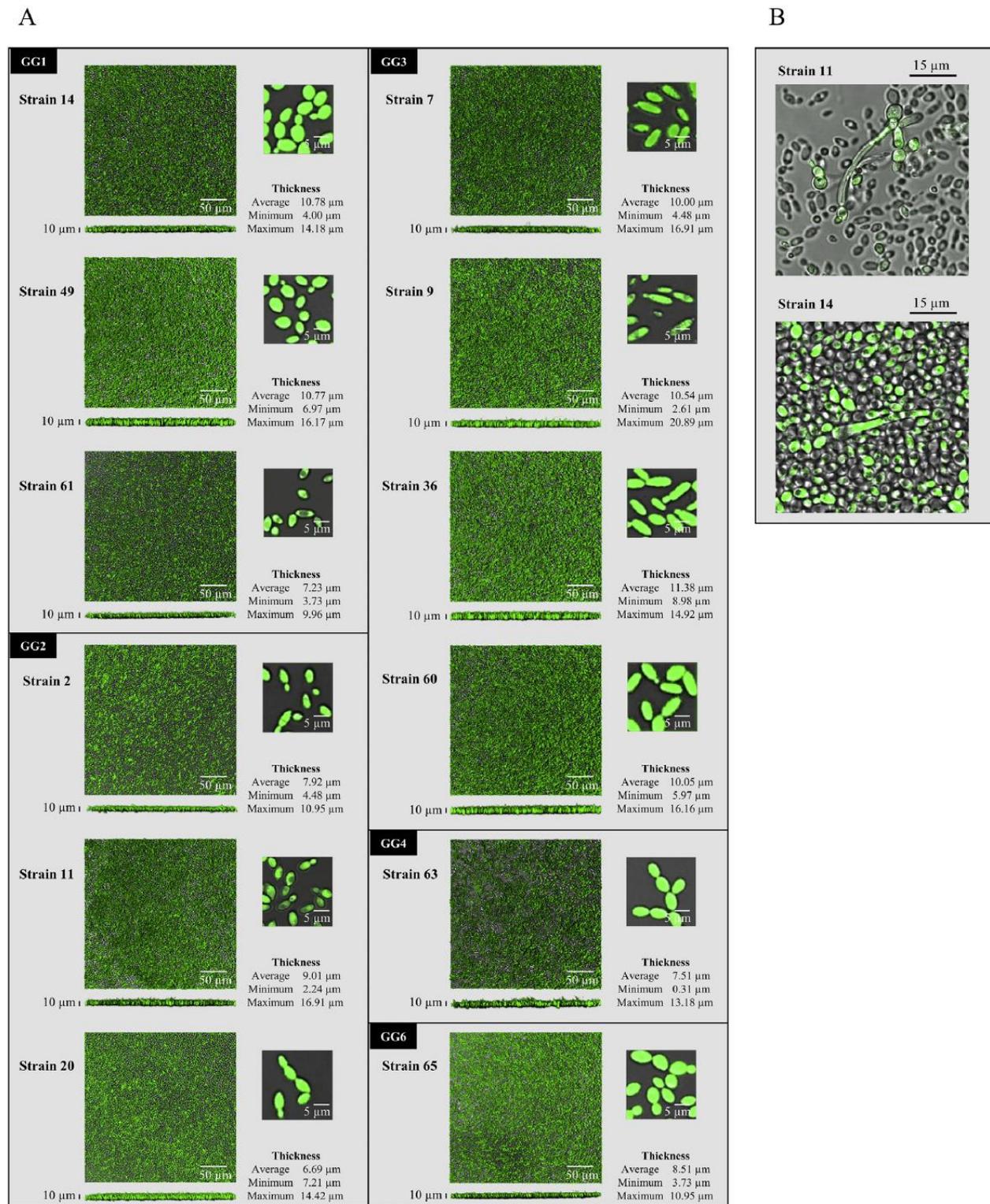


Fig. 1. CLSM observations of 7 day-aged biofilms formed on polystyrene plates for the 12 selected strains. Cells were fluorescently tagged with cFDA. (A) For each strain (i) three-dimensional reconstruction images of the biofilms generated a top view and side view, (ii) zoomed-in images focus on cells and (iii) the thickness of biofilms. The images are representatives of three independent biological replicates. (B) Filamentous cells in the biofilm formed by strains 11 and 14.

Table 3
Average values of cell area and of length to width (l/w) ratio and shape of the cells for the 12 selected strains obtained from CLSM images.

Genetic group	Strain	Average l/w	Average cell area (μm^2)	Shape
GG1	14	1.53 ± 0.19	17.10 ± 2.55	Round
	49	1.56 ± 0.18	14.34 ± 2.39	Round
	61	1.91 ± 0.30	12.75 ± 2.63	Rice grain
GG2	2	1.89 ± 0.25	10.77 ± 2.44	Rice grain
	11	1.92 ± 0.42	11.26 ± 3.49	Rice grain
	20	1.93 ± 0.27	12.06 ± 2.15	Rice grain
GG3	7	2.35 ± 0.42	16.13 ± 2.82	Elongated
	9	2.47 ± 0.31	17.34 ± 3.08	Elongated
	36	2.62 ± 0.46	15.79 ± 2.75	Elongated
	60	2.70 ± 0.51	16.74 ± 3.24	Elongated
GG4	63	2.08 ± 0.47	16.03 ± 2.79	Lemon
GG6	65	1.50 ± 0.20	16.57 ± 3.32	Round

polystyrene (Table 2).

Firstly, in order to confirm the ability of both strains to form biofilm in wine, SEM observations at 7 days were realized (Fig. 3B). Once again, the capacity of both strains to adhere and form microcolonies surrounded by EPS was demonstrated as well as the presence of filamentous cells, suggesting the beginning of a biofilm structure development. However, strain 14 presented only a few microcolonies scattered on the chips: adhesion and microcolony formation of strain 14 were more affected by the wine than strain 11. The *B. bruxellensis* cell growth on stainless steel chips was monitored in wine from 2 h to 14 days (Fig. 4). Strain 14 had a weak adhesion rate of 0.69% at 2 h compared to strain 11 (5.69%). This difference is maintained between the both strains until 7 days. However, after 2 h, for the both strains no growth was observed.

Secondly, the impact of wine on an established *B. bruxellensis* biofilm was investigated. A 7 day-aged biofilm (previously developed on stainless steel chips in YPD medium) was immersed in wine for enumeration of cells (i) on the chips and (ii) released into the wine (Fig. 5). For both strains, the amount of cells adhered on the stainless steel chip significantly decreased at 24 h and then remains stable for up to 14 days (Fig. 5A and B). As previously described, strain 14 was more affected by the wine than strain 11. Moreover, as early as 2 h, the impact of wine on biofilm led to the release of cells from chip with around 10^6 CFU/mL for the both strains (Fig. 5C and D). For strain 14, a decrease in the number of released cells was observed as early as 24 h before remaining stable up to 7 days. Then, a growth recovery was observed at 14 days. The same behaviour was observed for strain 11 in a lesser extent.

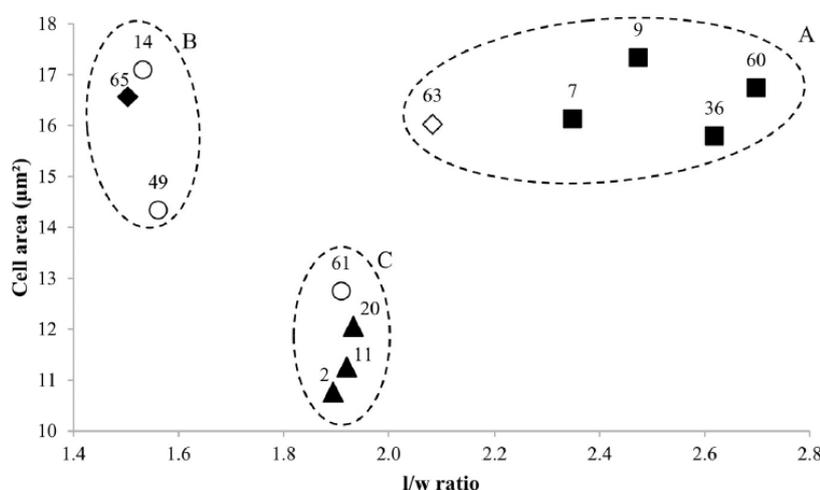


Fig. 2. Distribution of the 12 strains selected according to length to width (l/w) ratio and cell area measurements (CLSM images). The strains of each genetic group (GG) are represented by an icon: (○) GG1, (▲) GG2, (■) GG3, (◇) GG4 and (◆) GG6. Clustering in 3 areas A, B and C indicated by circles (ANOVA test and p -values ≤ 0.01).

3.3. Chlamyospore-like structure, a new piece of *B. bruxellensis* morphotype

Finally, SEM observations of 14 day-aged microcolonies of strain 11 in wine allowed observing specific round, large and free shaped cells (Fig. 6A). These structures are consistent with the definition of a chlamyospore, a morphological structure defined as larger than a yeast cell, highly refractile cells with thick walls derived from filamentous cells (Staub and Morschhäuser, 2007). Chlamyospore walls are composed by chitin, which can be stained by the calcofluor (Martin et al., 2005). Thus, the use of this staining coupled with epifluorescence microscopy observations allowed to reveal very refractive rounded structures with a thick wall for both strains 11 and 14 grown for 14 days in wine (Fig. 6B).

4. Discussion

The ability of microorganisms to form biofilm has been pinpointed out (Bastard et al., 2016) as one of the strategies of withstanding wine stresses. Up to now, few studies have highlighted the capacity of *B. bruxellensis* to develop into biofilm-like structure (Ishchuk et al., 2016; Joseph et al., 2007; Kregiel et al., 2018; Poupault, 2015; Tristezza et al., 2010). The analysis methods used staining method associated with OD measurement, luminometry or Calgary Biofilm Device system (MBEC™ P & G assay). The first methods are rapid but quite imprecise. The latter, allowing the enumeration of *B. bruxellensis* biofilm-like structures in CFU/peg, could not be compared with the other methods of biofilm quantification. However, none of these studies described the structure of biofilm formed by *B. bruxellensis* using microscopy, except Poupault (2015). For the present study, a protocol adapted from an established method of numbering bacterial biofilm populations (Bastard et al., 2016) was developed to study the biofilm formation of *B. bruxellensis* yeast on different supports such as polystyrene plates and stainless steel chips. Cells were placed in the same physiological state, allowing to compare the capacity of different strains to form a biofilm (Bastard et al., 2016; Rieu et al., 2014; Stepanović et al., 2007). Moreover, microscopic observations of biofilm structures have been performed to obtain better insight into the biofilm structure of *B. bruxellensis*. The both microscopy methods used highlight different points. CLSM allowed notably to gain information on the shape of the cells and the thickness of the biofilm-like structure while SEM enable to observe easily different cell structures (i.e. cells, filaments, chlamyospores) and EPS. The 7 day-aged biofilms formed by the *B. bruxellensis* strains studied in this work had an average thickness of $9.45 \mu\text{m}$, which is rather thin compared to biofilms described for other yeast species (Bojsen

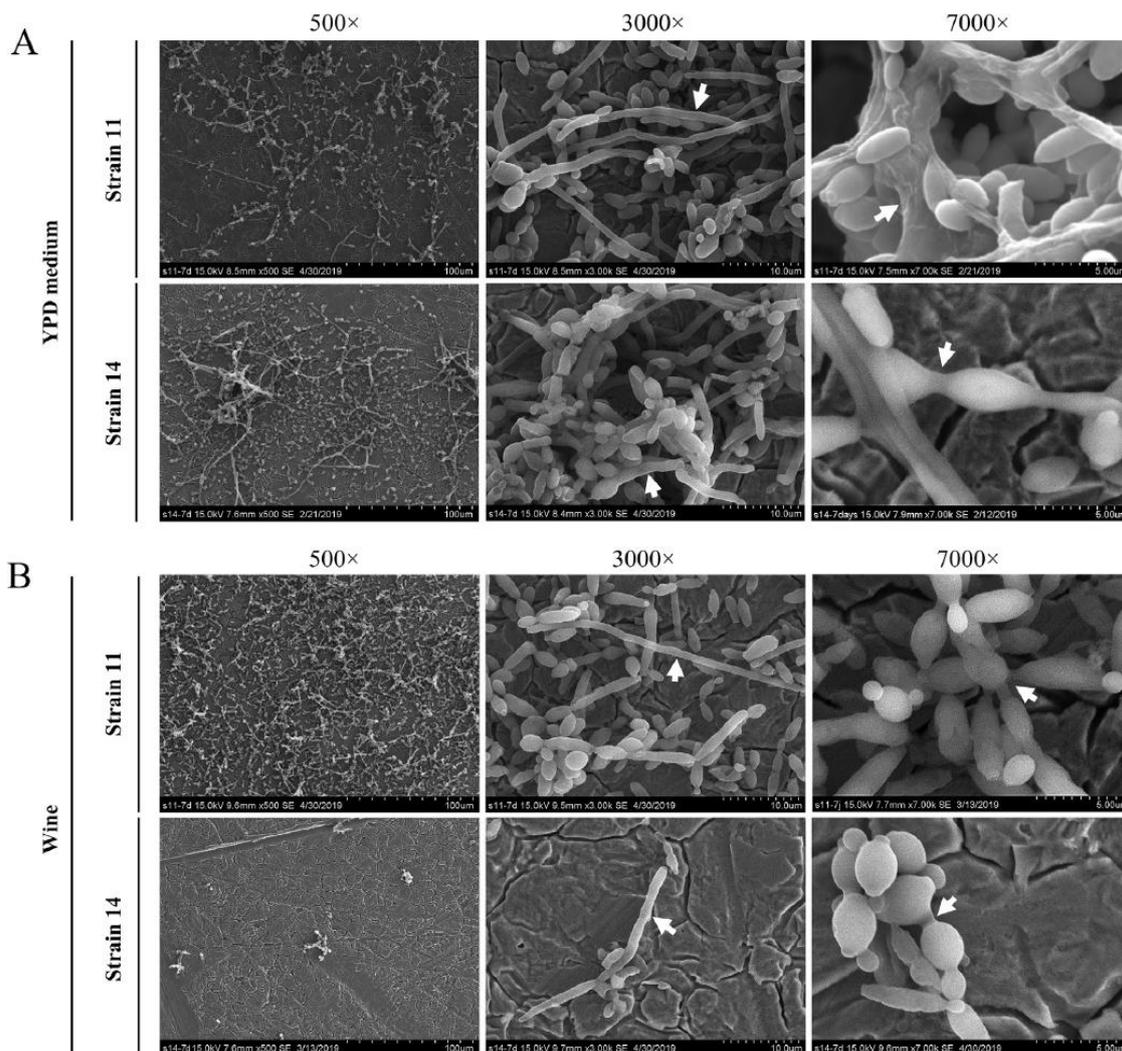


Fig. 3. SEM observations of 7 day-aged microcolonies of strains 11 and 14 developed on stainless steel chips in (A) YPD medium and (B) in wine. Magnifications were performed (i) at 500 \times : development of the microcolonies on the stainless steel surface, (ii) at 3000 \times : filamentous cells (indicated by white arrows), and (iii) at 7000 \times : microcolonies with EPS (indicated by white arrows). The images are representatives of three independent biological replicates.

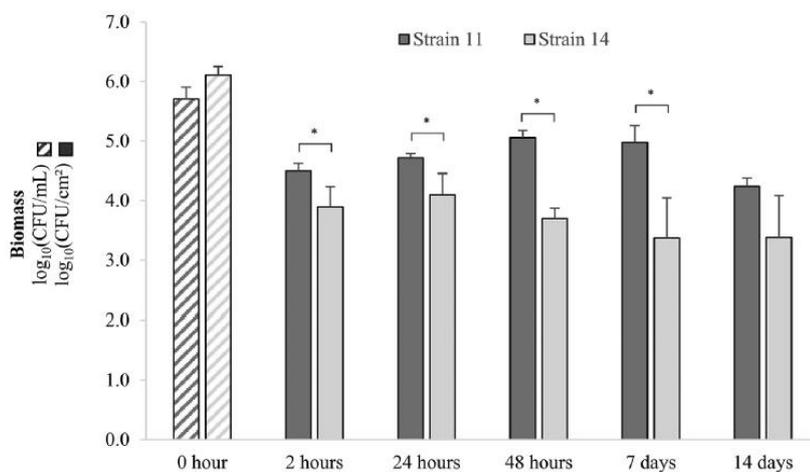


Fig. 4. Microcolony growth on stainless steel chips in wine for strains 11 and 14 ($\log_{10}(\text{CFU}/\text{cm}^2)$). Planktonic inoculum was expressed in CFU/mL . Errors bars represent the standard deviation between three independent biological replicates. Statistical analysis is performed between both strain at each time (ANOVA, p -value ≤ 0.05).

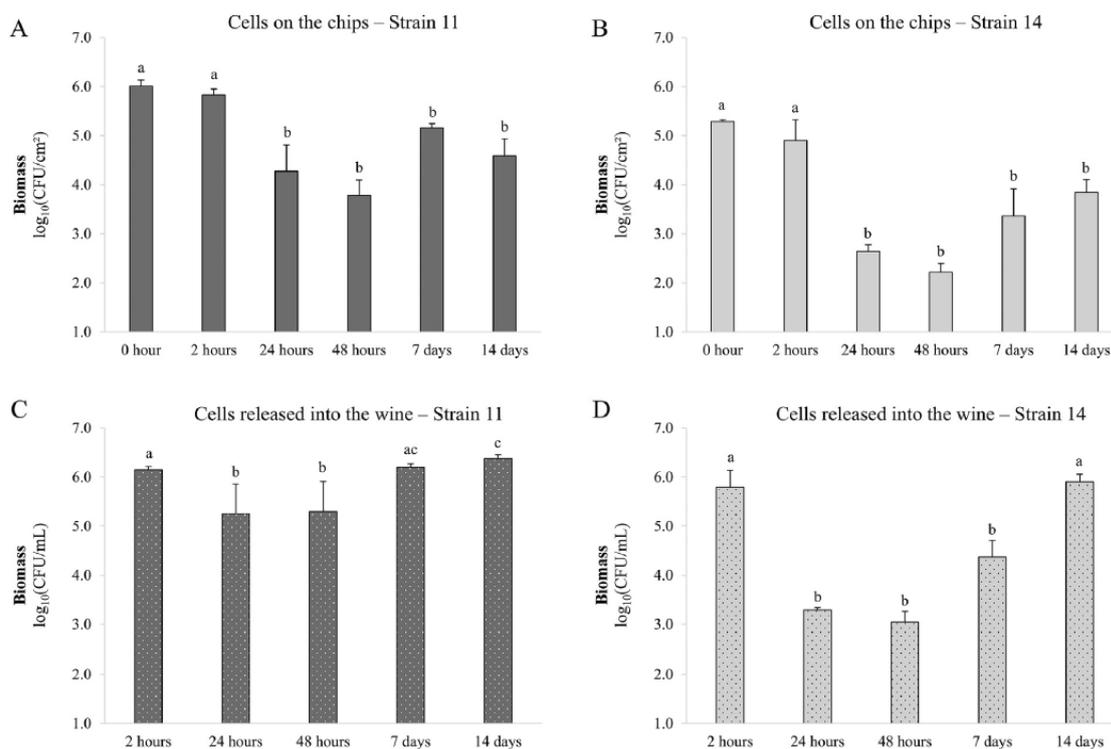


Fig. 5. Microcolony behavior in wine for (i) cells developed on the chips: (A) strain 11 and (B) strain 14, (ii) cells released from biofilm into the wine: (C) strain 11 and (D) strain 14. Initial populations were 1.1×10^6 CFU/cm² and 2.0×10^5 CFU/cm² respectively for strains 11 and 14. Errors bars represent the standard deviation between three independent replicates. A different letter indicates a significant difference (ANOVA, p -value ≤ 0.05).

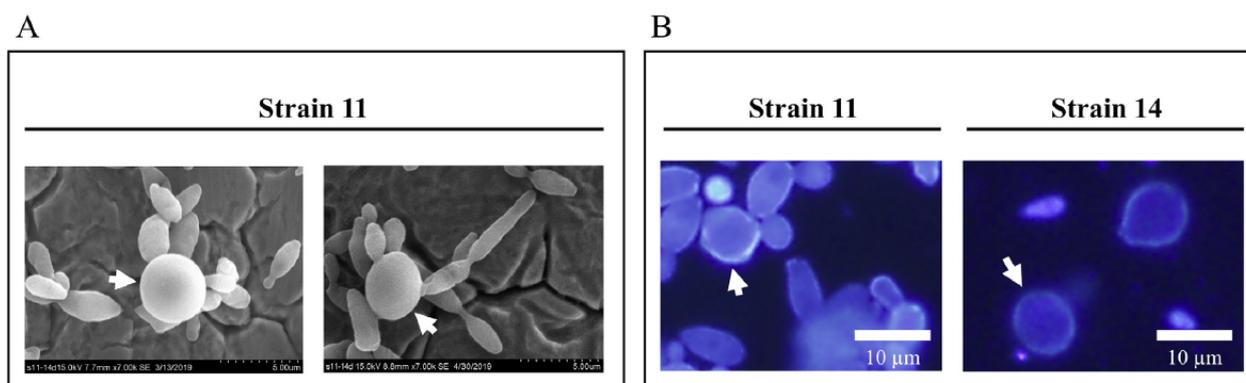


Fig. 6. Microscopic observations of "chlamyospore-like" structures produced by *B. bruxellensis* in wine. (A) SEM observations (magnification at 7000 \times) of 14 day-old microcolonies developed on stainless steel chips in wine. (B) Epifluorescence microscopy observations after calcofluor staining of adapted planktonic cell cultures of strains 11 and 14 in wine for 14 days. White arrows indicate a "chlamyospore-like" structure.

et al., 2014). However, *Candida albicans* biofilms reach thicknesses ranging from 8 to 84 μm depending on the surrounding environment (Daniels et al., 2013; Nweze et al., 2012). Other yeasts such as *S. cerevisiae* and *Rhodotorula mucilaginosa* presented only microcolonies without any multi-layered architecture (Andersen et al., 2014; Nunes et al., 2013).

In this work, CLSM and SEM observations revealed the presence of several filamentous cells that appeared to start from the base of the biofilm and extend upward, suggesting the beginning of a multilayer structure. Similar organizations have been identified in biofilms of *C. albicans* and *C. tropicalis* with a basal layer composed of yeast cells and an upper layer composed of filamentous cells collectively embedded in

an extracellular matrix (Daniels et al., 2013; Jones et al., 2014; Park et al., 2017).

Among *B. bruxellensis* morphological features, the specific cell morphology observed in biofilm (based on cell area, length and width measurements) could be related to the genetic group (determined by Avramova et al., 2018a), even if it need to be confirmed with a larger number of strains.

Since *B. bruxellensis* is the major spoilage yeast of wine, it was crucial to enrich the information available on its capacity to form biofilms in enological environments. So, 2 strains of *B. bruxellensis* with different morphologies and different capacities to form biofilm in YPD medium were selected. Both strains were able to form microcolonies on

stainless steel chips in wine even if strain 14 showed lower adhesion and development at 2 weeks than strain 11. Stressful environment of wine had also a strong impact on 7 day-aged microcolonies with cell release in a strain-dependent manner. After a decrease of cell population released in wine, probably due to cell death and/or to the entry in viable but non culturable (VBNC) state (Serpaggi et al., 2012), growth restarted after several days. As described for other microorganisms, the biofilm mode of life may allow *Brettanomyces* to persist in wine and wine-related environments (Bastard et al., 2016). The role of EPS in stress resistance as a function of their nature and proportion in the matrix has been highlighted in several microorganisms (Flemming and Wingender, 2010). By observing EPS in *B. bruxellensis* biofilm, this study provides the basis for new fields of investigation into the resistance of *B. bruxellensis*. No data being available on EPS in *B. bruxellensis* biofilm, it will be necessary to identify the chemical nature of the EPS and then study their specific role in stress resistance mechanisms.

Finally, microscopic observations of planktonic and biofilm cultures in wine unexpectedly revealed the presence of “chlamyospore-like” structures that have never been observed for *B. bruxellensis*. We observed structures larger than a yeast cell, highly refractile with thick walls and derived from filamentous cells. Such characteristics were reported for the description of chlamyospore-like structures in *C. albicans* (Martin et al., 2005; Navarathna et al., 2016; Staib and Morschhäuser, 2007), *Cryptococcus neoformans* (Lin and Heitman, 2005) and the close relatives *C. albicans* and *C. dubliniensis* cultured in planktonic or biofilm conditions (Boucherit-Atmani et al., 2011; Citiulo et al., 2009; Staib and Morschhäuser, 2007). Chlamyospores were described as forms of resistance in some fungi like *Duddingtonia flagrans* (Ojeda-Robertos et al., 2009) or *Gibberella zeae* (Son et al., 2012), however in yeast, their role was never clearly identified, although a potential role in the long-term survival of *C. albicans* within the host or in resistance to host immunity was hypothesized (Navarathna et al., 2016; Staib and Morschhäuser, 2007). So, future works should be carried out to determine the role of these “chlamyospore-like” structures for *Brettanomyces* yeast.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Dimacell Imaging Facility, Agropur Dijon, INRA, INSERM, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon France and Marie-Laure Léonard and Jean-Marc Dachicourt (ESIREM, Université de Bourgogne, Dijon, France) for their technical assistance for the microscopic observations, and IFV Beaune and Nexidia SAS for providing *B. bruxellensis* strains.

Funding sources

This work was supported by the Regional Council of Bourgogne-Franche-Comté and the “Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)” [CRB 2016-9201AAO048S01632]; the “Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne (BIVB)” [CONV1617_04] and the Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation.

References

Albertin, W., Panfili, A., Miot-Sertier, C., Goulielmakis, A., Delcamp, A., Salin, F., Lonvaud-Funel, A., Curtin, C., Masneuf-Pomarede, I., 2014. Development of microsatellite markers for the rapid and reliable genotyping of *Brettanomyces bruxellensis* at strain level. *Food Microbiol.* 42, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.012>.

Alexandre, H., 2013. Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae*-their ecology, genetics and metabolism. *Int. J. Food Microbiol.* 167, 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.021>.

Alvarez-Ordóñez, A., Coughlan, L.M., Briandet, R., Cotter, P.D., 2019. Biofilms in food processing environments: challenges and opportunities. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 10, 173–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121805>.

Andersen, K.S., Bojsen, R., Sørensen, L.G.R., Nielsen, M.W., Lisby, M., Folkesson, A., Regenber, B., 2014. Genetic basis for *Saccharomyces cerevisiae* biofilm in liquid medium. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 4, 1671–1680. <https://doi.org/10.1534/g3.114.010892>.

Avramova, M., Cibrario, A., Peltier, E., Coton, M., Coton, E., Schacherer, J., Spano, G., Capozzi, V., Blaiotta, G., Salin, F., Dols-Lafargue, M., Grbin, P., Curtin, C., Albertin, W., Masneuf-Pomarede, I., 2018a. *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution. *Sci. Rep.* 8, 4136. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22580-7>.

Avramova, M., Vallet-Courbin, A., Maupeu, J., Masneuf-Pomarede, I., Albertin, W., 2018b. Molecular diagnosis of *Brettanomyces bruxellensis*' sulfur dioxide sensitivity through genotype specific method. *Front. Microbiol.* 9, 1260. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01260>.

Basmaciyan, L., Berry, L., Gros, J., Azas, N., Casanova, M., 2018. Temporal analysis of the autophagic and apoptotic phenotypes in *Leishmania* parasites. *Microb. Cell* 5, 404–417. <https://doi.org/10.15698/mic2018.09.646>.

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.* 7, 613. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00613>.

Bojsen, R., Regenber, B., Folkesson, A., 2014. *Saccharomyces cerevisiae* biofilm tolerance towards systemic antifungals depends on growth phase. *BMC Microbiol.* 14, 305. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0305-4>.

Boucherit-Atmani, Z., Seddiki, S.M.L., Boucherit, K., Sari-Belkharoubi, L., Kunkel, D., 2011. *Candida albicans* biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphoterin B. *J. Mycol. Med.* 21, 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2011.07.006>.

Bridier, A., Sanchez-Vizuete, P., Guilbaud, M., Piard, J.C., Naïtali, M., Briandet, R., 2015. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol.* 45, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.015>.

Bruvo, R., Michiels, N.K., D'Souza, T.G., Schulerburg, H., 2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Mol. Ecol.* 13, 2101–2106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02209.x>.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., Pons, M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60, 165–178. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740600205>.

Citiulo, F., Moran, G.P., Coleman, D.C., Sullivan, D.J., 2009. Purification and germination of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* chlamyospores cultured in liquid media. *FEMS Yeast Res.* 9, 1051–1060. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00533.x>.

Coenye, T., Nelis, H.J., 2010. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *J. Microbiol. Methods* 83, 89–105. <https://doi.org/10.1016/j.jmimet.2010.08.018>.

Conterno, L., Joseph, C.M.L., Arvik, T.J., Henick-Kling, T., Bisson, L.F., 2006. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 139–147.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995. Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>.

Daniels, K.J., Park, Y.N., Srikantha, T., Pujol, C., Soll, D.R., 2013. Impact of environmental conditions on the form and function of *Candida albicans* biofilms. *Eukaryot. Cell* 12, 1389–1402. <https://doi.org/10.1128/EC.00127-13>.

Davey, M.E., O'toole, G.A., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847–867. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>.

Flemming, H.-C., 2016. EPS—then and now. *Microorganisms* 4, 41. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4040041>.

Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.

Fugelsang, K.C., 1997. Wine microbiology. The Chapman and Hall Enology Library, New York.

Germec, M., Turhan, I., Demirci, A., Karhan, M., 2016. Effect of media sterilization and enrichment on ethanol production from carob extract in a biofilm reactor. *Energy Sources, Part A Recover. Util. Environ. Eff.* 38, 3268–3272. <https://doi.org/10.1080/15567036.2015.1138004>.

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>.

Ishchuk, O.P., Zeljko, T.V., Schifferdecker, A.J., Wisén, S.M., Hagström, Å.K., Rozpedowska, E., Andersen, M.R., Hellborg, L., Ling, Z., Sibirny, A.A., Piškur, J., 2016. Novel centromeric loci of the wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis* CEN1 and CEN2. *PLoS One* 11, e0161741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161741>.

Jachlewski, S., Jachlewski, W.D., Linne, U., Bräsen, C., Wingender, J., Siebers, B., 2015. Isolation of extracellular polymeric substances from biofilms of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3, 123. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00123>.

Jones, S.K., Hirakawa, M.P., Bennett, R.J., 2014. Sexual biofilm formation in *Candida tropicalis* opaque cells. *Mol. Microbiol.* 92, 383–398. <https://doi.org/10.1111/mmi.12565>.

Joseph, C.M.L., Kumar, G., Su, E., Bisson, L.F., 2007. Adhesion and biofilm production by wine isolates of *Brettanomyces bruxellensis*. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 373–378.

Kamvar, Z.N., Tabima, J.F., Grunwald, N.J., 2014. *Poppr*: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2, e281. <https://doi.org/10.7717/peerj.281>.

Kolter, R., Greenberg, E.P., 2006. The superficial life of microbes. *Nature* 441, 300–302. <https://doi.org/10.1038/441300a>.

Kregiel, D., James, S.A., Rygala, A., Berłowska, J., Antolak, H., Pawlikowska, E., 2018.

- Consortia formed by yeasts and acetic acid bacteria *Asaia* spp. in soft drinks. *Antonie Van Leeuwenhoek* 111, 373–383. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0959-7>.
- Lattay, K.A., Bramley, B.R., Francis, I.L., 2010. Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian cabernet sauvignon and shiraz wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 16, 189–202. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00069.x>.
- Lin, X., Heitman, J., 2005. Chlamyospore formation during hyphal growth in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 4, 1746–1754. <https://doi.org/10.1128/EC.4.10.1746-1754.2005>.
- 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.* 89, 620–630. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.019>.
- Martin, S.W., Douglas, L.M., Konopka, J.B., 2005. Cell cycle dynamics and quorum sensing in *Candida albicans* chlamydozoospores are distinct from budding and hyphal growth. *Eukaryot. Cell* 4, 1191–1202. <https://doi.org/10.1128/EC.4.7.1191-1202.2005>.
- Mayer, C., Moritz, R., Kirschnner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., Flemming, H.-C., 1999. The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Int. J. Biol. Macromol.* 26, 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00057-4](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00057-4).
- Møretro, T., Langsrud, S., 2017. Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16, 1022–1041. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12283>.
- Navarathna, D.H.M.L.P., Pathirana, R.U., Lionakis, M.S., Nickerson, K.W., Roberts, D.D., 2016. *Candida albicans* ISW2 regulates chlamydozoospore suspensor cell formation and virulence *In Vivo* in a mouse model of disseminated candidiasis. *PLoS One* 11, e0164449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164449>.
- Nunes, J.M., Bizerra, F.C., Ferreira, R.C. e, Colombo, A.L., 2013. Molecular identification, antifungal susceptibility profile, and biofilm formation of clinical and environmental *Rhodotorula* species isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 382–389. <https://doi.org/10.1128/AAC.01647-12>.
- Nweze, E.I., Ghannoum, A., Chandra, J., Ghannoum, M.A., Mukherjee, P.K., 2012. Development of a 96-well catheter-based microdilution method to test antifungal susceptibility of *Candida* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 149–153. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr429>.
- O'Connell, H.A., Kottkamp, G.S., Eppelbaum, J.L., Stubblefield, B.A., Gilbert, S.E., Gilbert, E.S., 2006. Influences of biofilm structure and antibiotic resistance mechanisms on indirect pathogenicity in a model polymicrobial biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5013–5019. <https://doi.org/10.1128/AEM.02474-05>.
- Oelofse, A., Pretorius, I.S., du Toit, M., 2008. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. *South African J. Enol. Vitic.* 29, 128–144. <https://doi.org/10.21548/29-2-1445>.
- Ojeda-Robertos, N.F., Torres-Acosta, J.F.J., Ayala-Burgos, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Valero-Coss, R.O., Mendoza-de-Gives, P., 2009. Digestibility of *Duddingtonia flagrans* chlamydozoospores in ruminants: *in vitro* and *in vivo* studies. *BMC Vet. Res.* 5, 46. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-46>.
- Paradis, E., Claude, J., Strimmer, K., 2004. APE: analyses of phylogenies and evolution in R language. *Bioinformatics* 20, 289–290. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg412>.
- Park, Y., Srikantha, T., Daniels, K.J., Jacob, M.R., Agarwal, A.K., Li, X., Soll, D.R., 2017. Protocol for identifying natural agents that selectively affect adhesion, thickness, architecture, cellular phenotypes, extracellular matrix, and human white blood cell impenetrability of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e01319–17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01319-17>.
- Poupault, P., 2015. Caractérisation des phénomènes de bio-adhésion à l'origine des altérations des vins. In: *Vigne et vin publications internationales* (Ed.), Proceedings of the 10th International Symposium of Enology of Bordeaux. Œno 2015, Bordeaux, France, pp. 234–237.
- Renouf, V., Lonvaud-Funel, A., 2007. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiol. Res.* 162, 154–167. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.02.006>.
- Renouf, V., Falcou, M., Miot-sertier, C., Perello, M.-C., de Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2006. Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1208–1219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02959.x>.
- Renouf, V., Miot-sertier, C., Perello, M.-C., de Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2009. Evidence for differences between *B. bruxellensis* strains originating from an enological environment. *Int. J. Wine Res.* 1, 95–100. <https://doi.org/10.2147/IJWR.S4612>.
- Rieu, A., Weidmann, S., Garmyn, D., Piveteau, P., Guzzo, J., 2007. *agr* system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6125–6133. <https://doi.org/10.1128/AEM.00608-07>.
- Rieu, A., Aoudia, N., Jegou, G., Chluba, J., Youfi, N., Briandet, R., Deschamps, J., Gasquet, B., Monedero, V., Garrido, C., Guzzo, J., 2014. The biofilm mode of life boosts the anti-inflammatory properties of *Lactobacillus*. *Cell. Microbiol.* 16, 1836–1853. <https://doi.org/10.1111/cmi.12331>.
- Rubio, P., Garjo, P., Santamaría, P., López, R., Martínez, J., Gutierrez, A.R., 2015. Influence of oak origin and ageing conditions on wine spoilage by *Brettanomyces* yeasts. *Food Control* 54, 176–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.034>.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184, 1140–1154. <https://doi.org/10.1128/JB.184.4.1140>.
- Schiffedercker, A.J., Dashko, S., Ishchuk, O.P., Piškur, J., 2014. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. *Yeast* 31, 323–332. <https://doi.org/10.1002/yea>.
- 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 Microbiol.* 30, 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.020>.
- Smith, B.D., Divol, B., 2016. *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages. *Food Microbiol.* 59, 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.008>.
- Son, H., Lee, J., Lee, Y.W., 2012. Mannitol induces the conversion of conidia to chlamydozoospore-like structures that confer enhanced tolerance to heat, drought, and UV in *Gibberella zeae*. *Microbiol. Res.* 167, 608–615. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.04.001>.
- Staib, P., Morschhäuser, J., 2007. Chlamydozoospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* - an enigmatic developmental programme. *Mycoses* 50, 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2006.01308.x>.
- Stapanović, S., Vuković, D., Hala, V., Bonaventura, G., Di, Djukić, S., Circović, I., Ruzicka, F., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *Apmis* 115, 891–899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.
- Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A., Calderón, F., 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. *Food Chem.* 102, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.03.030>.
- 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. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix188>.
- Timke, M., Wolkung, D., Wang-Lieu, N.Q., Altendorf, K., Lipski, A., 2004. Microbial composition of biofilms in a brewery investigated by fatty acid analysis, fluorescence *in situ* hybridisation and isolation techniques. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 100–107. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1601-y>.
- Timke, M., Wang-Lieu, N.Q., Altendorf, K., Lipski, A., 2008. Identity, beer spoiling and biofilm forming potential of yeasts from beer bottling plant associated biofilms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 93, 151–161. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9189-8>.
- Tristezza, M., Lourenço, A., Barata, A., Brito, L., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2010. Susceptibility of wine spoilage yeasts and bacteria in the planktonic state and in biofilms to disinfectants. *Ann. Microbiol.* 60, 549–556. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0085-5>.
- Verstrepren, K.J., Klis, F.M., 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol. Microbiol.* 60, 5–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05072.x>.
- Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J., 2010. The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 1474–1479. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.010>.
- Zarnowski, R., Westler, W.M., Lacmbouh, G.A., Marita, J.M., Bothe, J.R., Bernhardt, J., Sahravi, A.L.H., Fontaine, J., Sanchez, H., Hatfeld, R.D., Ntambi, J.M., Nett, J.E., Mitchell, A.P., Andes, D.R., 2014. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio* 5, e01333-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01333-14>.