



HAL
open science

Recherches sur les propriétés de bioadhésion de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis*: applications à l'hygiène des caves et à la prévention de la contamination des vins

Paul Le Montagner

► To cite this version:

Paul Le Montagner. Recherches sur les propriétés de bioadhésion de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis*: applications à l'hygiène des caves et à la prévention de la contamination des vins. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2023. Français. NNT: 2023BORD0137 . tel-04633195

HAL Id: tel-04633195

<https://theses.hal.science/tel-04633195>

Submitted on 3 Jul 2024

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.

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Spécialité ŒNOLOGIE

Par

Paul LE MONTAGNER

**Recherches sur les propriétés de bioadhésion de l'espèce
Brettanomyces bruxellensis ; application à l'hygiène des caves et à
la prévention de la contamination des vins**

Sous la direction de : Pr. Isabelle MASNEUF-POMAREDE

Soutenue le 9 Juin 2023

Membres du jury :

Mme. COTON Monika, Maitresse de conférences, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteuse
M. BRIANDET Romain, Directeur de Recherche, INRAE	Rapporteur
Mme. DESROCHE-WEIDMANN Stéphanie, Maitresse de conférences, Université de Bourgogne	Examinatrice
M. DARRIET Philippe, Professeur, Université de Bordeaux	Président du jury
Mme MOINE Virginie, Directrice Scientifique, Biolaffort	Invitée
Mme. MASNEUF-POMAREDE Isabelle, Professeure, Bordeaux Sciences Agro	Directrice de Thèse

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Spécialité ŒNOLOGIE

Par

Paul LE MONTAGNER

**Recherches sur les propriétés de bioadhésion de l'espèce
Brettanomyces bruxellensis ; application à l'hygiène des caves et à
la prévention de la contamination des vins**

Sous la direction de : Pr. Isabelle MASNEUF-POMAREDE

Soutenue le 9 Juin 2023

Membres du jury :

Mme. COTON Monika, Maitresse de conférences, Université de Bretagne Occidentale	Rapporteuse
M. BRIANDET Romain, Directeur de Recherche, INRAE	Rapporteur
Mme. DESROCHE-WEIDMANN Stéphanie, Maitresse de conférences, Université de Bourgogne	Examinatrice
M. DARRIET Philippe, Professeur, Université de Bordeaux	Président du jury
Mme MOINE Virginie, Directrice Scientifique, Biolaffort	Invitée
Mme. MASNEUF-POMAREDE Isabelle, Professeure, Bordeaux Sciences Agro	Directrice de Thèse

« Les espèces qui survivent, ce ne sont pas les plus fortes, ni les plus intelligentes. Ce sont celles qui s'adaptent le mieux aux changements »

Charles DARWIN

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier sincèrement ma directrice de thèse, la Professeure Isabelle Masneuf-Pomarede de m'avoir fait confiance dans la réalisation de ce projet de thèse. Merci infiniment pour vos conseils, votre écoute et votre bienveillance et vos encouragements durant ces 3 années. Par ces remerciements, je lui exprime toute ma reconnaissance.

Je tiens ensuite à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté de juger ce travail. Merci à Monika Coton et Romain Briandet pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également Stéphanie Desroche-Weidmann et Philippe Darriet d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je tiens également à remercier la société Biolaffort et le laboratoire Excell pour le financement de cette thèse. En particulier Luc Laffort, directeur général du groupe Laffort et Vincent Renouf, directeur du laboratoire Excell d'avoir accepté en 2020, dans un contexte sanitaire incertain, de financer ce travail. J'adresse également mes remerciements à Virginie Moine, directrice scientifique de Biolaffort pour son encadrement, ses conseils et sa bienveillance durant ces 3 ans.

Je souhaite également remercier Vincent Renouf pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir partagé son savoir et sa passion pour l'œnologie. Merci également de m'avoir permis d'échanger et de présenter mes travaux aux professionnels de la filière ; Merci à l'ensemble des membres du laboratoire Excell pour leur gentillesse et leur accueil. Merci à Tommaso pour son intérêt pour mes travaux et nos discussions scientifiques. Un énorme merci à Laetitia, qui depuis mon premier jour au laboratoire a été présente pour moi. Merci pour ton soutien, tes conseils, ta gentillesse et ta présence et ton amitié. Je remercie également mes collègues de la microbio, Clémentine et Camille pour les bons moments passés mais je remercie surtout Cécile mon binôme de choc de la microbio pour nos moments de rigolade, son écoute, sa gentillesse et ses Cécilades.

Cette thèse a conduit à de nombreuses collaborations et je tiens à exprimer toute ma gratitude aux personnes avec qui j'ai pu collaborer :

Merci à Morgan Guilbaud et Marie-Noëlle Bellon-Fontaine de l'UMR Sayfood d'AgroParisTech de m'avoir formé à distance sur l'analyse des propriétés de surface des cellules ainsi que sur la bioadhésion. Merci pour votre gentillesse, vos conseils ainsi que pour l'analyse des matériaux.

Merci à Lysiane Brocard, responsable du Pôle végétal du Bordeaux Imaging Center de m'avoir formé à la microscopie confocale et pour son aide pour l'acquisition de photos détaillées de *B. bruxellensis*. Merci également à Isabelle Svhan du pôle électronique pour la microscopie électronique à balayage pour son aide et sa patience dans la recherche des plus belles Brett.

Enfin merci à Anne Friedrich, Victor Loegler et Joseph Schacherer du laboratoire GMGM de Strasbourg pour l'aide sur l'identification des déterminants génétiques qui s'avère être prometteuse. Merci également à Joseph pour les bons moments passés en congrès à Strasbourg et Vancouver.

J'adresse mes sincères remerciements aux Professeurs Philippe Darriet et Patrick Lucas, directeurs successifs de l'UMR Cénologie de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire. Je remercie également les membres de l'axe Microbiologie de l'UMR Cénologie pour les discussions, réunions, conseils et écoutes. Merci également à toutes les personnes du couloir rouge pour nos discussions pas toujours très scientifiques au coin café. Merci aux Bretty People Cécile Miot-Sertier, Warren Albertin, Patricia Ballestra, Marguerite Dols-Lafargue, Isabelle Masneuf-Pomarede, Julie Miranda, Jules Harrouard et Pierre Moulis pour nos discussions et nos collaborations concernant notre bestiole favorite Brett.

Un énorme merci à Cécile Miot-Sertier pour toute l'aide que tu m'as apporté, les conseils, les dépannages de dernière minute et surtout ton implication dans le bon fonctionnement du labo et les moments de rigolade. Un grand merci à Warren Albertin pour son écoute, ses conseils et surtout son aide dans l'analyse des résultats sur R. Je tiens également à remercier Marguerite Dols-Lafargue pour ses conseils et sa bienveillance. Merci à Philippe Marullo pour nos discussions et ses conseils sur mes expérimentations. Merci à Émilien Peltier pour son aide dans l'analyse des phénotypes.

Un énorme merci à Charlotte Vion, Jules Harrouard, Warren Albertin, Émilien Peltier et Philippe Marullo pour leur aide et dépannage sur R. Sans eux l'analyse des données aurait été beaucoup plus compliquée. Vive DépannR !!

Merci à la cellule de transfert Microflora : Julie Maupeu, Amélie Vallet-Courbin et Marine Lucas pour leur bonne humeur et l'aide qu'elles m'ont apporté durant ma thèse. Julie, merci pour tous les conseils que tu m'as donnés, nos longues discussions et ton humour qui remonte directement le moral.

Je remercie également Laura Farris avec son accent italien qui donne tout de suite le sourire. Merci pour les bons moments de rigolade lors de l'éraflage et du pressage de tes raisins. Merci pour ton écoute et ta bienveillance. Bon courage pour ta fin de thèse !

Je tiens également à remercier les stagiaires qui ont collaborés à mes travaux de thèse Solène Durand et Yacine Bakhtiar.

Merci à Justine, Marie LS, Émilie, Jules, Gauthier, Charles et Tom avec qui j'ai créé l'asso des doctorants ADPI pour les tous les moments passés ensemble dont l'organisation de la journée des doctorants. Longue à l'ADPI !!

Je tiens également à remercier mes colocataires de bureau : Paulette, Inès, Margot, Asma, Hugo, Xavier et Pierre. Merci pour tous les bons moments passés, nos rigolades, les petit-dej... Merci d'avoir supporté mon humour (même si ça vous fait souvent bien rire) et de m'avoir supporté moi durant la rédaction du manuscrit.

Merci à Amel, Sara, Juju, Margot (alias Chantal) et Édouard pour votre accueil à mon arrivée et de m'avoir intégré à la grande famille des doctorants de l'ISVV. Merci à Sara, ma grande sœur du labo pour tout ce dont tu m'as apporté au labo que ce soient les conseils, l'aide ou encore une oreille à qui me confier.

Adeline, mille mercis pour toute l'aide que tu m'as apporté et surtout pour ton amitié depuis 3 ans.

Charlotte et Pierre, mes collègues de rédaction, merci pour nos pauses, l'entraide dans la gestion des galères administratives et surtout bon courage pour la dernière ligne droite.

Enfin, un grand merci à l'ensemble des amis du labo pour toutes les pauses repas passées ensemble, nos fous rires, les sorties dans les bars, les week-ends... Merci ainsi à Adeline, Paulette, Sara, Amel, Justine L, Justine G, Mathilde, Julie, Florencia, Yasma, Charlotte, Sayoko, Mathilde, Inès, Lisa, les Marie³ (Marie A, Marie C et Marie LS), Margot P, Margot L, Manon, Laura, Pierre, Xavier, Hugo, Édouard, Gauthier, Jules, Tom, Emilio, Benjamin, François...

Je terminerai enfin mes remerciements par mon entourage. Merci à mes amis bretons les plus proches Alexane, Chloé, Flavie, Justine, Maelle, Pauline, Brendan, Huseyin, Léo et Romain pour leur soutien constant et leur présence malgré la distance. Merci pour ce que vous êtes et ce que vous m'apportez au quotidien. Merci à mes amis de la fac, Adeline, Inès, Justine, Estelle, Yvann pour les encouragements et d'être toujours présents au cours des années. Adeline, Inès et Estelle je vous souhaite bon courage pour la fin de vos thèses.

Enfin, je tiens à remercier ma famille. Merci à mes grands-mères et mon cousin pour leur présence et pour avoir toujours soutenu mes choix.

Pour finir, je remercie mes parents à qui je dois tout. Merci de votre soutien indéfectible et pour l'éducation que vous m'avez apporté me permettant d'arriver là où j'en suis aujourd'hui.

Résumé : Recherches sur les propriétés de bioadhésion de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* ; applications à l'hygiène des caves et à la prévention de la contamination des vins

Brettanomyces bruxellensis est une levure rencontrée dans de nombreuses boissons fermentées (vins, bière, cidre, téquila, kombucha). En œnologie, cette espèce est considérée comme une levure d'altération, produisant des phénols volatils qui évoquent des odeurs de sueur de cheval, d'écurie et masquent la perception des arômes fruités des vins rouges. *Brettanomyces bruxellensis* présente une grande capacité d'adaptation au milieu vin en lien avec sa tolérance à l'éthanol et aux sulfites, principal antiseptique utilisé en vinification. Le génotypage récent des souches de *Brettanomyces bruxellensis* a permis de mettre en évidence une très grande diversité génétique au sein de cette espèce. Il a ainsi été montré que les isolats pouvaient être répartis dans six grands groupes génétiques en fonction de leur niveau de ploïdie et de l'origine du substrat. La cave est considérée comme la principale source à l'origine de la contamination des vins. En effet, il est possible de retrouver *B. bruxellensis*, dans l'air, sur le sol et les murs ainsi que sur le matériel vinaire. Dans cet environnement hostile, *Brettanomyces bruxellensis* serait capable de vivre et de survivre, grâce à des aptitudes particulières d'adhésion et de colonisation des surfaces abiotiques pour former des édifices tridimensionnels encore appelés « biofilms ». Les principaux objectifs de cette thèse sont (i) de caractériser les propriétés physico-chimiques de surface et de bioadhésion d'un ensemble de souche représentatif de la diversité de l'espèce, (ii) d'étudier l'impact de facteurs biotiques et abiotiques sur la bioadhésion d'un sous ensemble d'individu présentant des comportements contrastés, (iii) d'évaluer la capacité à la formation de biofilm et les conséquences sur la contamination des vins (iv) d'explorer les zones à risques au chai et formuler des recommandations en terme de prévention de la contamination.

La caractérisation des propriétés physico-chimiques de surface et de bioadhésion a été réalisée sur un ensemble de 54 souches représentatif de la diversité génétique. Les souches sont hydrophiles et présentent une charge de surface négative avec des différences selon le groupe génétique. Concernant la capacité de bioadhésion, toutes les souches testées ont montré des aptitudes à bioadhérer sur l'inox avec cependant des différences selon le groupe génétique, les souches du groupe bière présentent le comportement bioadhésif le plus marqué. Une corrélation entre hydrophobicité et bioadhésion a pu être mise en évidence. Le pH et la concentration en éthanol n'ont pas d'impact significatif sur la bioadhésion, la variance étant principalement expliquée par le facteur souche, montrant que ce phénotype serait déterminé au niveau génétique. Un travail complémentaire de phénotypage à grande échelle (170 souches) confirme que *Brettanomyces* possède la capacité à croître et bioadhérer sous forme de pseudohyphes, en particulier pour certains isolats du groupe Kombucha, bioéthanol. La capacité à former un biofilm est souche dépendante et variable selon les modèles pluri-souches ou pluri-espèces, la présence d'un biofilm bactérien limitant la bioadhésion par *Brettanomyces* ; les cellules bioadhérées peuvent se décrocher et contaminer à nouveau le vin en produisant des phénols volatils. Enfin, les analyses de surface au chai ont confirmé la présence de *Brettanomyces* sur certains équipements de la cuverie, avec une capacité de bioadhésion plus faible sur résine époxy par rapport) l'acier inoxydable.

Mots clés : *Brettanomyces bruxellensis* – Levure – Bioadhésion – Biofilm – Vin – Contamination

Abstract: Research on bioadhesion properties of the species *Brettanomyces bruxellensis*; applications for cellar hygiene and the prevention of wine contamination

Brettanomyces bruxellensis is a yeast found in many fermented beverages (wine, beer, cider, tequila, kombucha). In oenology, this species is considered a spoilage yeast, producing volatile phenols that remind smells of horse sweat, stable and mask the perception of fruity aromas of red wines. *Brettanomyces bruxellensis* has a great capacity to adapt to the wine environment in connection with its tolerance to ethanol and sulphites, the main antiseptic used in winemaking. Recent genotyping of *Brettanomyces bruxellensis* strains has revealed a very high genetic diversity within this species. It was shown that isolates could be divided into six major genetic groups according to their level of ploidy and the origin of the substrate. The winery is the main source of wine contamination. Indeed, it is possible to find *B. bruxellensis*, in the air, on the ground and walls as well as on wine equipment. In this hostile environment, *Brettanomyces bruxellensis* would be able to live and survive, thanks to special abilities of adhesion and colonization of abiotic surfaces to form three-dimensional edifices also called "biofilms". The main objectives of this thesis are (i) to characterize the surface physico-chemical and bioadhesion properties of some strains representatives of the species diversity, (ii) to study the impact of biotic and abiotic factors on the bioadhesion of a subset of individuals with contrasting behaviors, (iii) to evaluate the capacity for biofilm formation and the consequences on wine contamination (iv) to explore risk areas in the cellar and make recommendations in terms of contamination prevention.

The characterization of surface chemico-physical properties and bioadhesion was carried out on a set of 54 strains representative of genetic diversity. The strains are hydrophilic and have a negative surface charge with differences depending on the genetic group. Regarding the bioadhesion capacity, all the strains tested showed abilities to bioadhere to stainless steel with differences according to the genetic group, the strains of the beer group have the most marked bioadhesive behavior. A correlation between hydrophobicity and bioadhesion has been highlighted. pH and ethanol concentration do not have a significant impact on bioadhesion, the variance being mainly explained by the strain factor, showing that this phenotype would be determined at the genetic level. Complementary phenotyping work on a large scale (170 strains) confirms that *Brettanomyces* can grow and bioadhere as pseudohyphae, especially for some isolates of the Kombucha and Bioethanol groups. The ability to form a biofilm is strain-dependent and according to multi-strain or multi-species models, the presence of a bacterial biofilm limiting bioadhesion by *Brettanomyces*. Bioadhered cells can detach and contaminate the wine again by producing volatile phenols. Finally, surface analyses in the cellar confirmed the presence of *Brettanomyces* on certain equipment in the winery, with the presence of different genetic groups within the same sample. According to the results obtained for contaminated wines, genetically identical isolates were identified in geographically distant properties.

Keywords: *Brettanomyces bruxellensis* – Yeast – Bioadhesion – Biofilm – Wine – Spoilage

Communications Scientifiques :

Articles publiés et en cours de rédaction

Le Montagner, P., Guilbaud, M., Miot-Sertier, C., Brocard, L., Albertin, W., Ballestra, P., Dols-Lafargue, M., Renouf, V., Moine, V., Bellon-Fontaine, M.-N., Masneuf-Pomarède, I., 2023. High intraspecific variation of the cell surface physico-chemical and bioadhesion properties in *Brettanomyces bruxellensis*. Food Microbiology 112, 104217. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104217>

Renouf, V., Etourneau, L., **Le Montagner, P.**, Masneuf-Pomarede, I., 2022. De l'intérêt de connaître le fonctionnement du consortium microbiologique de sa cave pour mieux gérer les risques de contamination par *Brettanomyces*. Revue française d'oenologie 36–45.

Le Montagner, P., Etourneau, L., Ballestra, P., Dols-Lafargue, M., Albertin, W., Maupeu, J., Renouf, V., Masneuf-Pomarède, I., Identification of critical areas for *Brettanomyces bruxellensis* detection in the cellar; on the origin of wine spoilage, in prep

Le Montagner, P., Miot-Sertier, C., Albertin, W., Dols-Lafargue, M., Moine, V., Masneuf-Pomarède, I., Effect of abiotic and biotic factors on *Brettanomyces bruxellensis* bioadhesion properties, in prep

Communications orales

Le Montagner, P., Guilbaud, M., Miot-Sertier, C., Brocard, L., Albertin, W., Ballestra, P., Dols-Lafargue, M., Renouf, V., Moine, V., Bellon-Fontaine, M.-N., Masneuf-Pomarède, I., 2023. Bioadhesion properties of *Brettanomyces bruxellensis*: on the origin of wine spoilage. 36th International Specialised Symposium on Yeasts, Vancouver, Canada 12-15 Juillet 2022

Le Montagner, P., Miot-Sertier, C., Brocard, L., Guilbaud, M., Albertin, W., Ballestra, P., Dols-Lafargue, M., Etourneau, L., Renouf, V., Bellon-Fontaine, M.-N., Masneuf-Pomarède, I., Intraspecific variability of surface physico-chemical and bioadhesion properties of *Brettanomyces bruxellensis*. 14th International Conference Levures, Modèles et Outils, Strasbourg, France, 27-29 Octobre 2021

Ballestra, P., **Le Montagner, P.**, Courtade, E., Pistien, C., Vinsonneau, E., Miot-Sertier, C., Brocard, L., Albertin, W., Guilbaud, M., Bellon Fontaine, M.-N., Dols-lafargue, M., Masneuf-Pomarède, I., Persistence de la levure d'altération *Brettanomyces bruxellensis* au chai : quel lien avec les propriétés e bioadhésion ? Colloque Bioadh, En ligne, 17 mars 2021

Table des matières

Liste des abréviations	1
Liste des figures (article non inclus)	3
Liste des tableaux (article non inclus)	7
Liste des annexes	8
Introduction Générale	9
Chapitre 1 : Étude Bibliographique	15
Partie 1. Les biofilms : le principal mode de vie communautaire des microorganismes. ..	17
1. Historique	17
2. Définition	18
3. Le cycle de vie d'un biofilm	20
4. Composition de la matrice extracellulaire	21
5. Avantages du système biofilm	22
6. Les biofilms dans le domaine médicale	24
6.1. Les biofilms bactériens	25
6.2. Les biofilms levuriens	26
7. Les biofilms dans l'industrie agroalimentaire	28
7.1. Aspects positifs des biofilms en agroalimentaire	28
7.2. Aspects négatifs des biofilms en agroalimentaire	30
8. Les biofilms en œnologie	31
8.1. Les itinéraires de vinification	32
8.2. Les biofilms bactériens	34
8.3. Les biofilms levuriens	35
8.3.1. Les biofilms chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
8.3.2. Les biofilms chez les levures non- <i>Saccharomyces</i>	37
Partie 2. <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	38

1. <i>Histoire et origines</i>	38
2. <i>Besoins nutritionnels</i>	39
2.1. Les sources carbonées	39
2.2. Assimilation de l'azote.....	40
2.3. Métabolisme des substrats carbonés.....	41
3. <i>Morphologie</i>	42
4. <i>Diversité génétique de l'espèce</i>	43
5. <i>Brettanomyces bruxellensis dans l'industrie brassicole</i>	46
6. <i>B. bruxellensis et la filière bio-éthanol</i>	48
7. <i>B. bruxellensis et la production de kombucha</i>	50
8. <i>Brettanomyces bruxellensis en œnologie : un ennemi à combattre</i>	51
8.1. Contamination des vins	52
8.2. Impact de <i>B. bruxellensis</i> sur les qualités organoleptiques des vins	53
8.3. Prévention, détection et élimination de <i>B. bruxellensis</i>	55
8.4. Rémanence et persistance à la cave.....	58
8.5. La formation de biofilm une réponse à la persistance de l'espèce au chai ?	59
 <i>Chapitre 2 : High intraspecific variation of the cell surface physico-chemical and bioadhesion properties in Brettanomyces bruxellensis</i>	63
 <i>Partie 1. High intraspecific variation of the cell surface physico-chemical and bioadhesion properties in Brettanomyces bruxellensis (Article publié dans Food Microbiology)</i>	67
 <i>Partie 2. Du phénotype au déterminant génétique : étude préliminaire</i>	79
1. <i>Contexte</i>	79
2. <i>Matériels et Méthodes</i>	80
2.1. Souches et culture cellulaire	80
2.2. Croissance pseudohyphale (cellules planctoniques)	80

2.3.	Bioadhésion (formes cellulaires classiques et pseudohyphales)	80
3.	<i>Résultats et discussion</i>	81
3.1.	Cellules pseudohyphales planctoniques.....	81
3.2.	Cellules pseudohyphales bioadhérées	83
3.3.	Bioadhésion des cellules classiques	85
3.4.	Analyse intégrative des trois phénotypes	86
	References	89
	<i>Chapitre 3 : Effect of abiotic and biotic factors on Brettanomyces bruxellensis</i>	
	<i>bioadhesion properties</i>	91
	Abstract	95
	1. Introduction	96
	2. Materials and methods	97
2.1.	Abiotic factors	97
2.1.1.	Strains and growth conditions	97
2.1.2.	Growth and adaptation protocol to abiotic factors	98
2.1.3.	Cell surface charge	99
2.1.4.	Cell surface hydrophobicity.....	100
2.1.5.	Pseudohyphae growth	100
2.1.6.	Bioadhesion properties	100
2.2.	Multi-strains biofilm	101
2.2.1.	Strains and growth adaptation.....	101
2.2.2.	Bioadhesion and biofilm.....	102
2.2.3.	Enumeration of bioadhered cells by cultivation	102
2.2.4.	Biofilm thickness	102
2.2.5.	Genetic identification.....	103
2.3.	Pluri-species biofilm	103
2.3.1.	Strains and growth adaptation.....	103
2.3.2.	Bioadhesion and biofilm.....	104
2.3.3.	Cultivable cells enumeration.....	104
2.3.4.	Scanning Electron Microscopy (SEM).....	105
2.4.	Statistical analysis	105

3. Results.....	105
3.1. Effect of biotic factors on <i>B. bruxellensis</i> on cell surface and bioadhesion properties	105
3.2. Mixed-strains biofilm.....	107
3.3. Pluri-species biofilm	111
4. Discussion.....	115
4.1. Abiotic factors poorly impact on cell surface and bioadhesion properties.....	115
4.2. Effect of mixed-strain and mixed-species biofilm	117
5. Conclusion	119
References	120
Chapitre 4 : Identification of critical areas for <i>Brettanomyces bruxellensis</i> detection in the cellar: on the origin of wine spoilage	129
Abstract	133
1. Introduction	134
2. Materials and Methods	135
2.1. Sampling	135
2.2. Aerocollection	135
2.3. Surface sampling	136
2.4. Swab	136
2.5. Identification at species and strain levels.....	136
2.5.1. Identification at species level by MALDI-TOF MS.....	136
2.5.2. Genetic analysis by microsatellite markers	136
2.6. Bioadhesion property of the strains isolated from surface	138
2.7. Bioadhesion for phenols monitoring.....	138
2.7.1. Wine adaptation.....	138
2.7.2. Stainless steel bioadhesion and biofilm	139
2.7.3. Bioadhered cells quantification.....	139
2.7.4. Planktonic cells quantification	139
2.7.5. Biofilm thickness	139

2.8.	Phenols quantification.....	140
2.9.	Statistical analysis	140
3.	Results.....	141
3.1.	Detection of <i>B. bruxellensis</i> in the cellar environment	141
3.1.1.	Aerocollection	141
3.1.2.	Surface sampling	141
3.1.3.	Swab	142
3.1.4.	Genetic analysis of the colonies isolated on YPD-Brett medium	144
3.1.5.	Bioadhesion ability of <i>B. bruxellensis</i> strains collected from surfaces and equipment.....	144
3.2.	<i>B. bruxellensis</i> biofilm and volatile phenols production in wine	145
3.2.1.	Bioadhered and planktonic cells enumeration	145
3.2.2.	Biofilm thickness	147
3.2.3.	Volatile phenols production	147
4.	Discussion.....	148
4.1.	Cellar air, vats and valves are critical areas for the presence of <i>B. bruxellensis</i>	148
4.2.	<i>B. bruxellensis</i> biofilm in wine	151
5.	Conclusion	152
	References	152
	Chapitre 5 : Impact de différents matériaux sur les propriétés de bioadhésion de	
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	159
1.	Introduction	163
2.	Matériels et méthodes.....	165
2.1.	Souches et croissance cellulaire	165
2.2.	Adaptation au milieu WLM.....	165
2.3.	Propriété physico-chimique des matériaux.....	166
2.3.1.	Procédure de nettoyage des matériaux	166
2.3.2.	Mouillabilité des matériaux.....	166
2.3.3.	Énergie libre de surface.....	167
2.4.	Bioadhésion.....	167
2.4.1.	Support de bioadhésion	167

2.4.2.	Polymère antibiofilm.....	167
2.4.3.	Microscopie confocale	168
3.	Résultats	168
3.1.	Propriétés physico-chimique de surface des matériaux.....	168
3.2.	Effet du type de matériaux sur la bioadhésion	170
3.3.	Effet d'un traitement antibioadhésion par des biopolymères	172
4.	Discussion.....	173
4.1.	Capacité de bioadhésion de <i>B. bruxellensis</i> plus faible sur résine époxy.....	174
4.2.	Effet de polymères antifouling sur <i>B. bruxellensis</i>	175
5.	Conclusion	176
	Références	177
	Conclusion et Perspectives.....	185
	Références Bibliographiques	193
	Annexes	241

Liste des abréviations

- 4-EC: 4-ethylcatechol
4-EG: 4-ethylguaicol
4-EP: 4-ethylphenol
4-VC: 4-vinylcatechol
4-VG: 4-vinylguaicol
4-VP: 4-vinylphénol
AAB: Acetic Acid Bacteria
ADN: Acide Déoxyribonucléique
ATP: Adenosine Tri-phosphate
CFDA: 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate
CMI: Concentration Minimale Inhibitrice
CNV: Copy Number Variation
CO₂: Dioxyde de carbone
DAPI: 4',6-Diamino-2-phenylindole
EPS: Extracellular Polymeric Substances
FA: Fermentation Alcoolique
FML: Fermentation Malolactique
LAB : Lactic Acid Bacteria
LSA : Levures Sèches Actives
MALDI-TOF MS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry
MATS: Microbial Adhesion To Solvents
NaCl : Chlorure de sodium
NaOH: Hydroxyde de sodium
NS: Non-*Sacchromyces*
OIV: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin
PCA: Principal Component Analysis
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDMS: Polydiméthylsiloxane
PEG: Polyethylene glycol
PHA: Poly(3-hydroxyalkanoate)
PHAmcl: PHA medium-chain-length

PHBHHx: Poly[(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyhexanoate)]

PHBHV: Poly[(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalérate)]

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RSS: Rought Stainless Steel

SO₂: Dioxyde de soufre

SS: Stainless steel

SSS: Smooth Stainless Steel

SCOBY: Symbiotic Consortium Of Bacteria and Yeasts

SEM: Scanning Electron Microscopy

TCA: Trichloroanisol

UFC: Unités Formant Colonie

UV: Ultraviolet

VNC: Viable Non Cultivable

WLM: Wine Like Medium

Liste des figures (article non inclus)

Figure 1 : Microscope conçu par van Leuvenhoeck en 1668	18
Figure 2 : Observations des différentes structures présentées sous le terme de biofilm. Agrégats de cellules (production personnelle) (A), levures de voile formant un biofilm à l'interface air/liquide (Carbonero-Pacheco et al., 2022) (B), levures bioadhérées à un support solide (production personnelle) (C) et colonie dont l'architecture est spécifique (production personnelle) (D).	19
Figure 3 : Cycle de formation d'un biofilm (Aumeran et al., 2020)	20
Figure 4 : Impact d'une exposition à de forte température sur un biofilm	23
Figure 5 : Représentation schématique d'un biofilm mature avec différents mécanismes de résistance (Abebe., 2020).....	24
Figure 6 : Biofilm de <i>Candida albicans</i> associé à un cathéter médical (Nett and Andes., 2006)	27
Figure 7 : Itinéraire de vinification des vins rouges	32
Figure 8 : Biofilm vin-air formé par des levures de voile.....	36
Figure 9 : Cellules de <i>B. bruxellensis</i> en cours de division cellulaire et présentant des cicatrices de bourgeonnement (gauche) et cellules pseudophyphales bioadhérées (droite) (production personnelle).....	42
Figure 10 : Représentation schématique de la polyploïdie chez <i>Brettanomyces bruxellensis</i> . D'après Borneman et al., 2014	44
Figure 11 : Structure de la population de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> (Harrouard et al., 2022) Le niveau de ploïdie de chaque population a été schématisé, deux chromosomes représentent la diploïdie, trois chromosomes représentent la triploïdie. Les chromosomes gris clair, gris foncé et blancs représentent quant à eux les génomes haploïdes indépendants acquis par des espèces inconnues	46
Figure 12: Les différents styles de bière où <i>Brettanomyces bruxellensis</i> est associée au process de fabrication et leur typicité aromatique (Serra Colomer et al., 2019).....	47
Figure 13 : Process de production de bioéthanol à partir de déchets lignocellulosiques (Mamudu., 2019)	49
Figure 14 : Composition des communautés fongiques et bactériennes au sein de SCOBY de kombucha sectionnés obtenue par metabarcoding (Harrison and Curtin., 2021).	51
Figure 15 : Biosynthèse des phénols volatils. D'après Steenels et al., 2015.....	54

Figure 16 : Identification des groupes de clones identiques au sein d'une même propriété sur différents millésimes. Des isolats génétiquement identiques ont été regroupés en famille de clones (Cibrario et al., 2018).....	59
Figure 17 : Observations par microscopie électronique à balayage des cellules pseudohyphales et de chlamydospores au sein de cellules bioadhérées (Lebleux et al., 2020).....	61
Figure 18 : Répartition totale de nombre de souches en fonction de la proportion de cellules pseudohyphales planctoniques (n=170).....	82
Figure 19 : Proportion de cellules pseudohyphales en fonction du groupe génétique (n=170). Les lettres représentant les différents groupes de significativité définis par un test Kruskal Wallis (Agricolae package, R, p-value < 0,005).....	83
Figure 20 : Répartition totale des souches en fonction de la concentration en cellules pseudohyphales bioadhérées (n=130). La ligne en pointillé rouge représente la limite de détection.....	84
Figure 21 : Proportion de cellules pseudohyphales bioadhérées en fonction du groupe génétique (n=130). Les lettres représentant les différents groupes de significativité définis par un test Kruskal-Wallis (Agricolae package, R, p-value < 0,05).....	85
Figure 22 : Capacité de bioadhésion selon le groupe génétique de <i>B. bruxellensis</i> (n=170). Les lettres représentant les différents groupes de significativité définis par un test Kruskal-Wallis (Agricolae package, R, p-value < 0,05).....	86
Figure 23 : A. Représentation en heat map des phénotypes de bioadhésion (BA), de formation de cellules pseudohyphales planctoniques (PH_PK) et bioadhérées (PH_BA) sur 130 souches. Les couleurs de gauche correspondent aux différents groupes génétiques. B. Distribution théoriques (cercle noir) et réelle (cercle de couleur) des différents groupes génétiques par cluster. Utilisation d'un test χ^2	87
Figure 24 : Percentage of variance explained for the different factors and each parameter analyzed (multi-way Anova, p-value <0.05).....	106
Figure 25 : Dynamic of bioadhesion and biofilm mix formation between 2 genetically different strains of <i>B. bruxellensis</i> . A, C, E, G represent the population level of cultivable cells of each mix and single cell biofilm. B, D, F, H represent the proportion of each strain composing the mixes over time (n=90 colonies).....	109
Figure 26 : Monitoring the thickness of biofilms over time. Upper letter represents groups significantly different per day as defined by Kruskal-Wallis test (Agricolae package, R, p-value <0.05).....	110

Figure 27 : Scanning electron microscopy (SEM) observation of bioadhesion at different stages. A represents cells of *B. bruxellensis* and AAB (blue arrows) at day 14 with magnification x400; B is characterized by a magnification x10 000 of the Brett/AAB condition on day 14 highlighting the presence of crystals (white arrows) around the *B. bruxellensis* cell; C is an observation of a microcolony of *B. bruxellensis* and LAB on day 28 at magnification x 1000; D represents a magnification x 5000 of a microcolony with extracellular matrix (red arrows).
..... 114

Figure 28 : Genetic profiles from each winery according to microsatellite markers (Albertin et al., 2014). The different colors represent the genetic group (Avramova et al., 2018). A represent the profiles of the winery CH-1, B represent the profiles of the winery CH-3..... 144

Figure 29 : Growth monitoring of *B. bruxellensis*. (A) Enumeration of bioadhered cells (B) and Planktonic cells (values are mean of 3 independent analysis)..... 146

Figure 30 : Monitoring the thickness of bioadhered cells on stainless steel (values are mean of 3 independent analysis)..... 147

Figure 31 : Production of volatile phenols by *B. bruxellensis* (values are mean of 3 independent analysis) 148

Figure 32 : Capacité de bioadhésion de *B. bruxellensis* sur différents matériaux retrouvés en oenologie. Epoxy : résine époxy ; RSS : acier inoxydable non-poli ; SSS : acier inoxydable poli. Les lettres indiquent des différences significatives (Kruskall Wallis, p-value < 0,05) 170

Figure 33 : Capacité de bioadhésion sur différents matériaux selon la souche de *B. bruxellensis*. Les lettres indiquent des différences significatives (Kruskall Wallis, p-value < 0,05) 171

Figure 34 : Capacité de bioadhésion sur différents polymères présentant des activités antibiofilms. Le vert représente les cellules vivantes et le rouge les cellules mortes). Les lettres indiquent des différences significatives (Kruskall Wallis, p-value < 0,05)..... 173

Liste des tableaux (article non inclus)

Tableau 1 : Impact de la présence de biofilm de levure dans l'industrie agroalimentaire	30
Tableau 2 : Classification de acides aminés selon leur potentiel d'assimilation en présence ou non d'oxygène. D'après Parente et al., 2018	41
Table 3: List of the 17 strains of <i>Brettanomyces bruxellensis</i> used in this study and originated from the Microbiological Resources Center Oenology (CRBO collection), the Australian Wine Research Institute collection (AWRI collection), the Fungal Biodiversity Center collection (CBS-KNAW collection), Foggia University collection (GSP collection) and from the Laboratory for Molecular Genetics, Genomics and Microbiology collection (YJS collection) (*Avramova et al., 2018)	98
Table 4: Experimental design applied in the experimentation on pH and ethanol effects on <i>B. bruxellensis</i> cell surface and bioadhesion properties	99
Table 5: List of the 4 strains used in the mix composition according to their genetic groups (*Avramova et al., 2018) and bioadhesion properties (**Chapter 2)	101
Table 6 : Monitoring over time of populations of culturable microorganisms in pluri-species biofilms.	112
Table 7 Microsatellite markers used for genotyping	137
Table 8 Detection and enumeration of microbes in the air of different cellars (*enumeration is indicated as the minimal and maximal colonies counts)	141
Table 9 : Detection and enumeration of yeasts by surface sampling from various materials and different wineries (*enumeration is indicated as the minimal and maximal colonies counts)	142
Table 10 : Detection and enumeration of yeasts by swabbing in different wineries (*enumeration is indicated as the minimal and maximal colonies counts)	143
Tableau 11 : Liste des souches <i>B. bruxellensis</i> utilisées pour cette étude en fonction de leur groupe génétique et substrat d'origine (*Avramova et al., 2018).....	165
Tableau 12 : Mesures des angles de contact et d'énergie libre de surface de différents matériaux œnologiques. γ^D représente les composantes Dispersive-Lifshitz-van der Waals, γ^S représente la composante polaire et γ^T représente l'énergie libre totale. Les mesures ont été réalisées en triplicata pour chaque matériau et des mesures d'angle de contact ont été effectuées sur au moins huit positions par coupon (valeurs moyennes)	169

Liste des annexes

Annexe 1 : Liste des 170 souches de <i>B. bruxellensis</i> utilisées pour le phénotypage de bioadhésion et de croissance pseudohyphale (chapitre 2)	243
Annexe 2 : Validation of <i>B. bruxellensis</i> isolates identification by MALDI-TOF MS analysis	244

Introduction Générale

Sur Terre, plus de 80% de la biomasse microbienne est identifiée sous la forme de biofilm du fait des avantages apportés par ce mode de vie alors que la forme planctonique ou libre dans l'environnement est considérée comme transitoire. Ce mode de vie confère aux microorganismes qui le composent une plus grande résistance face aux agressions extérieures. Dans certains domaines, la présence de ces biofilms engendre de sérieux problèmes sanitaires du fait de la difficulté à éliminer les microorganismes présents sous cette forme par des procédures de désinfections standards.

En œnologie, les microorganismes impliqués dans le processus de transformation du raisin en vin sont présents au vignoble à la surface de la baie de raisin mais également à la cave sur les revêtements des murs, sols et équipements vitivinicoles. Malgré la mise en œuvre de procédures d'hygiène de nettoyage et de désinfection, les microorganismes sont capables de survivre dans cet environnement hostile et pauvre en nutriments entre deux campagnes de vinification puis de coloniser le moût de raisin pendant la période des vendanges. Ainsi, la cave abrite un écosystème microbien complexe pouvant être une source d'inoculum d'espèces fermentaires d'intérêt (*Saccharomyces cerevisiae*, *Oenococcus oeni*) mais également de microorganismes indésirables tels que *Brettanomyces bruxellensis*. Cette espèce peut en effet altérer le vin par la production de phénols volatiles qui évoquent des odeurs de sueur de cheval, d'écurie masquant ainsi la perception des arômes fruités des vins rouges. Sa présence dans le vin peut provoquer un rejet définitif du consommateur et générer des pertes économiques importantes. A l'inverse, elle peut jouer un rôle positif dans d'autres boissons fermentées comme la bière et le kombucha. *Brettanomyces bruxellensis* présente une grande capacité d'adaptation aux milieux fermentaires en lien notamment avec sa haute tolérance à l'éthanol et aux sulfites, principaux antimicrobiens du vin. Malgré les nombreux travaux de recherche consacrés à cette espèce, les avancées restent limitées concernant la compréhension de l'origine et des causes de l'altération des vins, la complexité et la variabilité de la matrice vin rendant multifactorielle et en conséquence complexe l'analyse des facteurs propices à la croissance de la levure. Pourtant, des facteurs expliquant la fréquence élevée de vins rouges contaminés par *Brettanomyces bruxellensis* sont connus : vins avec des sucres résiduels et des pH élevés, gestion non adaptée du sulfitage, absence de soutirage et de filtration, dissémination importante de la levure dans les chais et les vins d'une même région par des barriques contaminées ou à l'échelle mondiale par l'importation de vins contaminés, niveau d'hygiène faible et procédure de nettoyage inadaptée. L'évolution de la composition des moûts et des vins dans le contexte des transitions actuelles de la filière (réduction voire absence de l'usage du dioxyde de soufre, augmentation du pH et de l'alcool du fait du changement climatique) aggrave également les risques de contamination

des vins. Par ailleurs, l'étude de la génétique des populations de l'espèce a permis de mettre en évidence une grande diversité génétique structurée en lien avec l'environnement d'origine et la ploïdie estimée.

Peu de travaux décrivent jusqu'à présent les phénomènes permettant à *B. bruxellensis* de persister au cours de la campagne de vinification ou de millésime en millésime au chai. Plusieurs résultats issus des prélèvements de surface réalisés dans l'environnement du chai laissent penser que *B. bruxellensis* posséderait la capacité à bioadhérer et former des biofilms expliquant ainsi la rémanence de l'espèce à la cave et la contamination récurrente des milieux fermentaires. Cependant, peu de données sont disponibles dans la littérature sur les phénomènes de bioadhésion de l'espèce, notamment en prenant en compte sa diversité génétique. Ce manque de données a conduit l'UMR Œnologie en collaboration avec le laboratoire Excell et la société Biolaffort à construire un projet de thèse Cifre dont l'objectif principal est la caractérisation des propriétés de bioadhésion et de formation de biofilm chez *B. bruxellensis* afin d'apporter des réponses dans la compréhension des mécanismes favorisant la persistance de l'espèce au chai. Ainsi, mes travaux de thèse ont principalement porté sur l'étude des caractéristiques de surface, des capacités de bioadhésion et de formation de biofilm chez *B. bruxellensis* ; le but étant d'identifier des facteurs (génétiques, biotiques et abiotiques) ayant un impact sur ces propriétés de bioadhésion. Dans un second temps, mes travaux de thèse visaient également à obtenir des informations visuelles sur la bioadhésion par la mise en œuvre d'approches microscopiques mais également des données pratiques au chai sur les surfaces et équipements étant les plus sujets à la contamination par *B. bruxellensis*.

Ce manuscrit de thèse est présenté sous forme de 5 chapitres groupant 1 chapitre bibliographique et 4 chapitres présentés sous forme d'articles scientifiques reprenant les différents objectifs de la thèse.

Le premier chapitre de cette thèse concerne l'étude bibliographique et comprend 2 parties : la première est consacrée à l'étude des biofilms et leurs impacts dans différents domaines. La seconde partie, quant à elle, est consacrée aux connaissances physiologiques, métaboliques et génétiques de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis*.

Le second chapitre de cette thèse présentera les travaux sur l'étude des propriétés physico-chimiques de surface, la morphologie et la capacité de bioadhésion de *B. bruxellensis*. Cette étude a été réalisée sur un sous-ensemble de souches (n=54) représentatif de la diversité génétique de l'espèce. Des approches physico-chimiques ont été utilisées pour la caractérisation des propriétés de surface alors que des approches microscopiques ont été mises en place pour mesurer la capacité de bioadhésion de l'espèce. Ces travaux ont conduit à la rédaction d'un

article scientifique publié dans Food Microbiology. Une partie de résultats complémentaires au chapitre 2 est également présentée ; il s'agit d'un travail préliminaire de phénotypage des propriétés de bioadhésion et de croissance pseudohyphale sur une large collection de souches (n=170). L'objectif de ce travail préliminaire est de valider sur un plus grand nombre d'individus, les résultats obtenus sur le sous-ensemble de 54 souches et de constituer une base de données phénotypiques à grande échelle. Le but final est d'identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents expliquant les phénotypes et leur variation selon le groupe génétique et la souche. Les données phénotypiques seront confrontées aux données de génomique (Genome-Wide Association Studies), disponibles grâce au séquençage et à l'assemblage récent des génomes en cours par l'équipe du Professeur Joseph Schacherer du laboratoire GMGM de Strasbourg.

Le chapitre 3 est consacré l'étude de l'impact de facteurs environnementaux sur la bioadhésion et la formation de biofilm chez *B. bruxellensis*. Concernant les facteurs abiotiques, la littérature rapporte que les propriétés de surfaces et de bioadhésion peuvent être impacter par différents paramètres comme le pH et la concentration en éthanol. Ainsi l'effet de ces facteurs sur les propriétés de surface et de bioadhésion a été étudié sur un sous-ensemble de 17 souches de *B. bruxellensis* présentant des propriétés de surface et de bioadhésion contrastées, à l'aide d'un plan d'expérience. Dans le vin, en dehors de *B. bruxellensis*, seules quelques espèces sont capables de maintenir une viabilité et une activité métabolique, en particulier les bactéries lactiques et acétiques. Par ailleurs, les travaux antérieurs menés au laboratoire montrent que différentes souches *B. bruxellensis* peuvent être responsables de la contamination d'un même échantillon de vin. Afin de prendre en compte la réalité de la composante microbienne du vin, la capacité de formation de biofilm a été évalué pour des couples de souches de *B. bruxellensis*. Enfin, l'effet de la présence de bactéries œnologiques sur la bioadhésion et la formation de biofilm par *B. bruxellensis* a également été étudié. Ces travaux feront l'objet d'une publication scientifique, l'article étant en préparation.

Le chapitre 4 présentera les résultats issus d'une campagne de prélèvements réalisés dans différents chais pendant la thèse afin d'identifier les zones où *B. bruxellensis* est le plus souvent rencontrée. Cette étude a été réalisée conjointement avec le laboratoire Excell. De plus, l'hypothèse selon laquelle la présence de surfaces contaminées et de biofilms au contact de vin peut être à l'origine de production de phénols volatils a été exploré. Ces travaux feront également l'objet d'une publication scientifique à soumettre dans la revue OENO One.

Enfin, le dernier chapitre de cette thèse portera sur l'impact des matériaux comme support de bioadhésion à *B. bruxellensis*. Ainsi différents matériaux rencontrés en œnologie ont été testés

selon leurs propriétés de surface. De plus, l'effet de polymères antifouling de diverses origines utilisés principalement dans le milieu marin a été testé sur *B. bruxellensis* comme nouvelles pistes dans la lutte vis-à-vis de la formation de biofilm par cette espèce.

Ce manuscrit de thèse se terminera par une conclusion générale synthétisant les résultats majeurs obtenus au cours de cette étude mais également par des perspectives à ce travail afin de poursuivre l'étude de la compréhension des modes de vie et des phénomènes de bioadhésion/biofilm chez *B. bruxellensis*.

Chapitre 1 : Étude Bibliographique

Partie 1. Les biofilms : le principal mode de vie communautaire des microorganismes

1. Historique

La découverte du monde microbien requiert du fait de la taille des organismes qui le composent, l'utilisation d'outils d'observation perfectionnés permettant un grossissement de la matière. Le premier outil permettant ce type de grossissement n'a été développé qu'en 1668 par un drapier néerlandais du nom de Antoni van Leeuwenhoek à partir de lentilles de verre poli afin de contrôler la qualité de ses confections (Haidar., 2016). Cet ancêtre du microscope actuel permettait un grossissement de l'ordre de 275x à probablement 500x (Fig. 1). Il faudra ensuite attendre 1674 pour que Antoni van Leeuwenhoek lui-même évoque l'observation d'organismes vivants microscopiques au sein d'une infusion de baies de poivre qui se révéleront être des protozoaires. Ceci est donc la première observation avérée et documentée d'organismes unicellulaires de l'histoire (Porter., 1976). En 1677, il déclara avoir observé la pellicule dentaire d'une personne et avoir vu « un nombre d'animalcules (bactéries) tellement important que le nombre de ces animalcules pouvait excéder le nombre d'habitants d'un royaume ». Il s'agit donc de la première documentation relatant l'existence d'un biofilm (pellicule dentaire) (Sauer et al., 2007). Il a également été le premier à observer des levures au sein d'un moût de bière en fermentation: « Some of these seen to be quite round, others are irregular, and some exceeded the other in size consisting of two, three or four of the aforesaid globules jointed together. » (Porter., 1976).

Il faudra attendre 1933 pour entendre à nouveau parler de biofilm avec Henrici, qui, après immersion d'une lamelle de verre dans l'eau d'un étang, a remarqué le développement d'une communauté de bactéries à la surface de cette lamelle. Cette communauté de bactéries était caractérisée par des microcolonies semblant être prisonnières d'une « gaine de gomme » permettant une adhésion à la surface du verre. Cette « gaine de gomme » est la première observation de la matrice formant le biofilm (Henrici., 1933 ; O'Toole., 2016). En 1935, des observations similaires sont réalisées en milieu marin avec, sans le savoir, une description des différentes étapes de formation d'un biofilm, l'attachement réversible et irréversible des microorganismes à une surface. En effet, Zobell rapporta : « it seems to take several minutes for the bacteria to cement themselves to the glass...But let the slide remained submerged for an

hour or two...they will be found profusely, so firmly glued to the slide that running water will not detach them » (Zobell and Allen., 1935 ; O'Toole., 2016).

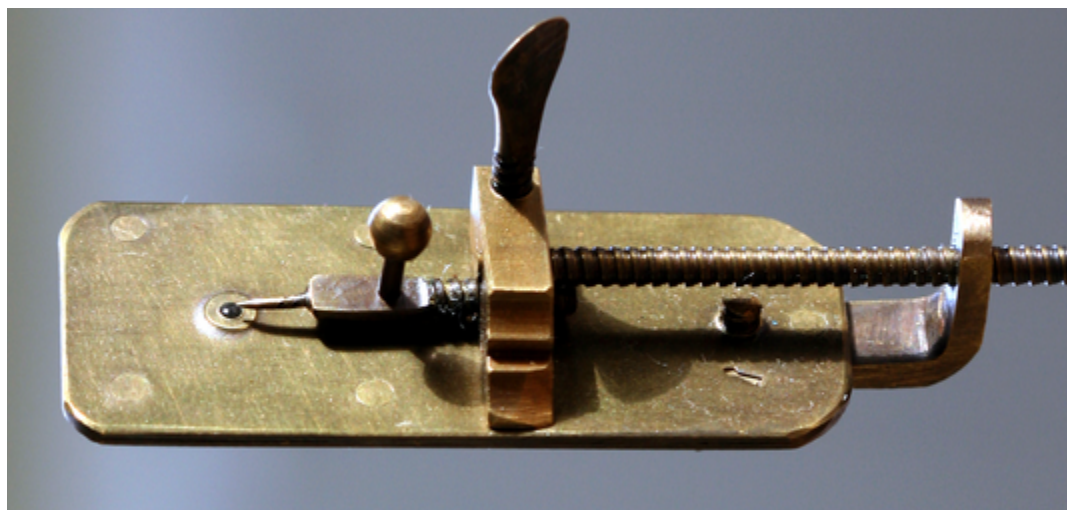


Figure 1 : Microscope conçu par van Leeuwenhoek en 1668

Il sera néanmoins nécessaire d'attendre les années 1970 avec la création du microscope électronique à transmission et les travaux de Bill Costerton pour obtenir des observations précises de bactéries et matrices extracellulaires (Costerton et al., 1978). Le terme de « biofilm » est utilisé pour la première fois en 1975 dans un article scientifique sur les microorganismes présents à la surface d'un filtre (Mack et al., 1975). Une revue pionnière décrivant les biofilms bactériens et les premières étapes de la formation d'un biofilm sera publiée par la suite (Costerton et al., 1999). Ces recherches ont été à ce jour citées près de 9000 fois et ont été le point de départ à de nombreux travaux menés sur les biofilms.

2. Définition

Le terme de biofilm est défini en 1999 comme une communauté de bactéries structurée, enveloppée dans une matrice de substances exopolymériques et adhérente à une surface (Costerton et al., 1999). Il est possible de rencontrer des biofilms dans des environnements divers et variés du fait qu'il s'agit du mode de vie préférentiel des microorganismes dans la nature. Il est estimé que plus de 80% de la biomasse microbienne terrestre est présente sous forme de biofilm jouant donc un rôle capital dans le bon fonctionnement de la plupart des écosystèmes présents sur Terre qu'ils soient anthropisés ou non (Richards and Melander., 2009 ; Flemming and Wuertz., 2019 ; Bridier and Briandet., 2022).

Cependant, la définition de biofilm proposée par Costerton en 1999 peut être de nos jours floue selon le domaine d'étude dans lequel est retrouvé le biofilm. En effet que l'on soit dans le domaine médical, l'agroalimentaire ou dans des environnements naturels, la conformation du

biofilm rencontré sera différente ainsi que sa composition. Si l'on s'intéresse aux levures, il est possible de rencontrer 4 structures de type biofilm : les agrégats de cellules où l'adhésion se produit entre les cellules elles-mêmes (Fig.2A) (Brückner and Mösch., 2012 ; Miki et al., 1982), les levures de voile présentes sous forme de film de cellules bioadhérées les unes avec les autres à l'interface air/liquide (Fig.2B) (Moreno-Garcia et al., 2017), les cellules adhérentes entre elles et à la surface d'un solide (Fig.2C) (Tek et al., 2018 ; Perpetuini et al., 2021) et enfin, les colonies formées de cellules adhérentes présentant une architecture particulièrement complexe (Fig.2D) (Tek et al., 2018). Sur les 4 structures énoncées précédemment, seule une correspond à la définition de Costerton de 1999, il s'agit des cellules adhérentes entre elles et à la surface d'un solide. Les autres formes peuvent donc être définies comme des biofilm-like du fait que toutes les caractéristiques des biofilms ne sont pas présentes.

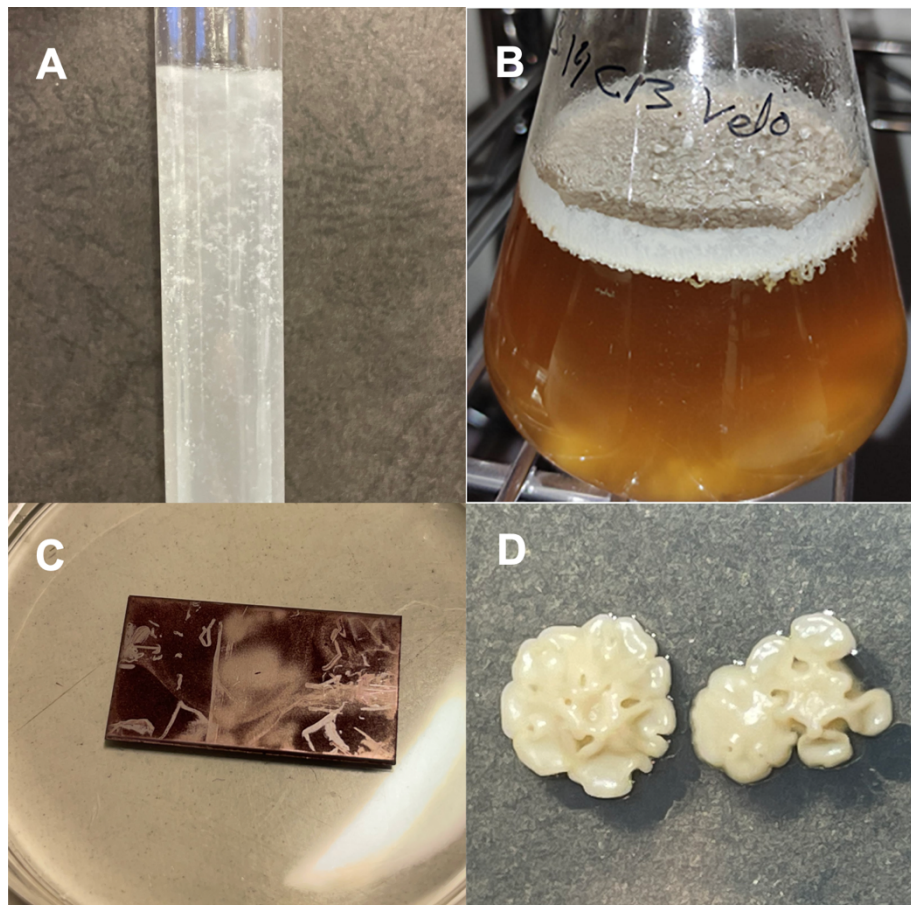


Figure 2 : Observations des différentes structures présentées sous le terme de biofilm. Agrégats de cellules (production personnelle) (A), levures de voile formant un biofilm à l'interface air/liquide (Carbonero-Pacheco et al., 2022) (B), levures bioadhérées à un support solide (production personnelle) (C) et colonie dont l'architecture est spécifique (production personnelle) (D).

3. Le cycle de vie d'un biofilm

Le passage d'un microorganisme de l'état planctonique à la forme sessile est accompagné d'une modification phénotypique liée à l'expression génique (Beloin et al., 2004 ; Guilhen et al., 2016). Ce changement phénotypique n'est pas seulement présent chez les bactéries mais également au sein du règne fongique. En effet, il est possible d'observer chez les champignons filamenteux ainsi que chez les levures la formation de biofilm (Blankenship and Mitchell., 2006 ; Harding et al., 2009 ; Riedl et al., 2019 ; Flemming and Wuertz., 2019 ; Zara et al., 2020 ; Zarnowski et al., 2021 ; Gosset et al., 2022). Bien que les mécanismes mis en jeu soient différents selon les espèces et les conditions environnementales, il est possible de retrouver 4 étapes majeures communes à la formation de biofilm pour tous les microorganismes.

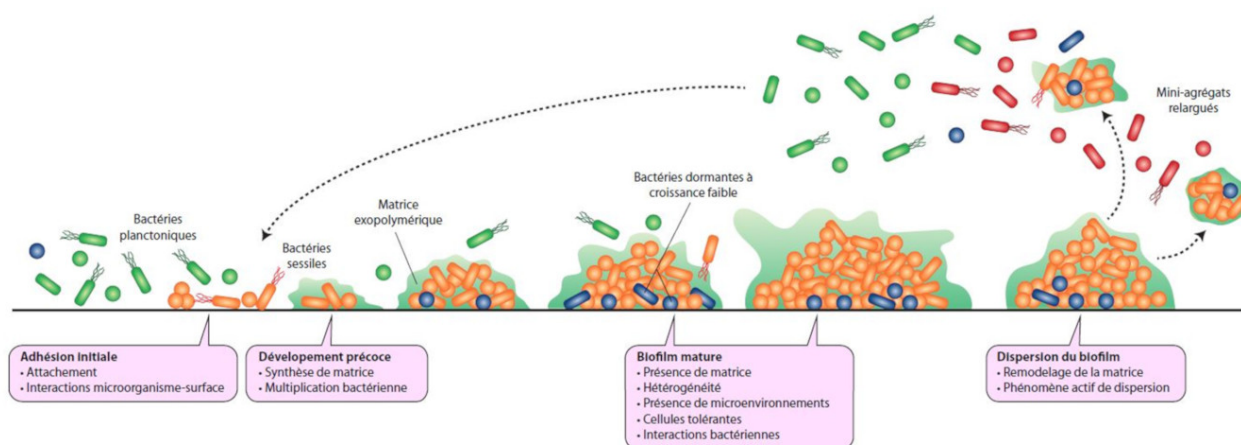


Figure 3 : Cycle de formation d'un biofilm (Aumeran et al., 2020)

Ces 4 étapes s'enchaînent comme suit : l'adhésion initiale, la croissance du biofilm, la maturation du celui-ci et enfin la dispersion (Fig. 3) (O'Toole et al., 2000., Percival et al., 2011). L'étape d'adhésion initiale peut être considérée comme étant la plus importante lors de la formation d'un biofilm car celle-ci conditionne la liaison du biofilm à son support (Blankenship and Mitchell., 2006 ; Percival et al., 2011 ; Bojsen et al., 2012). Lors de l'immersion d'un support dans un liquide, des minéraux, des éléments nutritifs présents dans celui-ci, peuvent venir s'y adsorber. Cette adsorption constitue un premier film permettant le conditionnement et par la même occasion la colonisation de l'objet (Donlan and Costerton., 2002).

Les cellules présentes dans le milieu vont pouvoir interagir avec la surface et initier des interactions cellule/surface. Il est alors possible de parler à cette étape d'adhésion « réversible » et ou d'adhésion « irréversible » selon les interactions mises en jeu (Sauer et al., 2002 ; Bojsen et al., 2012). Il s'agit préférentiellement d'interactions électrostatiques de van der Waals de faibles intensités et d'interactions hydrophobes. Ces cellules une fois adhérentes à un support

vont commencer à se multiplier de façon unilatérale afin de former une couche de cellules d'ancrage.

Avec ce premier film de cellules, l'étape de croissance du biofilm va se mettre en place. Elle consiste en une multiplication importante des cellules formant des microcolonies. Parallèlement à cette division cellulaire, il se produit la synthèse d'une matrice extracellulaire dont les objectifs premiers sont de renforcer l'adhésion des cellules entre elles mais surtout renforcer l'adhésion avec le support. Cette croissance du biofilm est directement liée à la croissance cellulaire et à la production de matrice extracellulaire qui va aboutir à la formation de structures tridimensionnelles (Walkers and Marsh., 2004).

La maturation de biofilm est initiée à la suite de signaux chimiques induits lorsque la concentration cellulaire atteint un certain seuil. Dès cette étape, les changements majeurs dans la composition du biofilm sont restreints et ne concernent plus que des modifications structurelles liées à la viabilité des cellules qui le composent (Walkers and Marsh., 2004).

La dernière étape d'un biofilm est la dissémination. Elle correspond à un décrochage de cellules pouvant survenir suite à l'effet mécanique d'un fluide ou soit du fait d'une carence en nutriment dans l'environnement voisin (Donlan., 2002). Il y a donc une remise en suspension des cellules du biofilm qui peuvent à leur tour coloniser une nouvelle surface et initier la croissance d'un biofilm.

4. Composition de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est considérée comme un amas de substances extracellulaires polymériques (EPS) issue directement des cellules présentes au sein du biofilm en formation (Flemming and Wingender., 2010). Elle constitue en moyenne 90% de la masse sèche d'un biofilm et est influencée à la fois par l'environnement et par les microorganismes qui composent le biofilm (Pierce et al., 2017). En effet, des nutriments et métabolites présents dans l'environnement peuvent venir s'adsorber à la surface des cellules et contribuer à la formation de la matrice (Sutherland., 2001). Les cellules en division sont les principales productrices des EPS constitutifs de la matrice qui sont le plus souvent constitués de polysaccharides, protéines, peptidoglycanes, acides nucléiques, lipides et phospholipides (Frølund et al., 1996 ; Czaczyk and Myszka., 2007 ; Flemming et al., 2007). Cette diversité de constituants est encore accentuée selon qu'il s'agisse d'un biofilm mono-espèce ou pluri-espèces (Mitchell et al., 2016). Ces EPS produits présentent, du fait de leurs propriétés physico-chimiques, des fonctions variées au sein du biofilm (Irie et al., 2005 ; Michel et al., 2011) comme l'adhérence, la structuration, et la rétention d'eau.

Les polysaccharides sécrétés et constitutifs de la matrice sont dépendants de la nature du microorganisme qui le compose mais se caractérisent généralement par de longues chaînes glucidiques linéaires ou ramifiées avec un poids moléculaire compris entre 500 et 2000 kDa (Frølund et al., 1996 ; Flemming and Wingender., 2010). Ces différents polysaccharides sont principalement des hétéropolysaccharides neutres et chargés. Les polysaccharides chargés négativement comme l'alginate sont liés entre eux par des cations multivalents renforçant ainsi la structure du biofilm en le rendant plus dense (Flemming and Wingender., 2010). Les polysaccharides chargés positivement quant à eux, comme l'adhésine polysaccharidique intercellulaire vont être impliqués dans l'agrégation cellulaire et la colonisation de surface particulièrement chez les espèces du genre *Staphylococcus* (Jefferson., 2009). Concernant les levures, les travaux se concentrent principalement sur *Candida albicans* qui produit des glucanes impliqués dans la résistance aux antibiotiques (Zarnowski et al., 2014).

Il est également possible de rencontrer un certain nombre de protéines au sein d'un biofilm jouant majoritairement un rôle dans la stabilité structurale de la matrice (Flemming and Wingender., 2010). Ces protéines appartiennent à la famille des adhésines et lectines permettant d'établir des liaisons entre des cellules mais également avec le support de bioadhésion (Diggle et al., 2006) ; et al.2010 ; Guo et al., 2021 ; Hassan and Al-Alaq., 2023). Les enzymes sont également produites par certains microorganismes et permettent l'hydrolyse des EPS à des fins énergétiques mais aussi assurer un réagencement organisationnel pour les cellules qui se multiplient et une dispersion du biofilm (Flemming and Wingender., 2010 ; Zarnowski et al., 2014).

L'étude des EPS a permis de mettre en évidence la présence d'acides nucléiques principalement sous forme d'ADNe (Flemming and Wingender., 2010 ; Zarnowski et al., 2014). Ces ADNe sécrétés par les cellules jouent un rôle dans le maintien et la stabilité du biofilm et sont pour la plupart issus de la lyse des cellules mortes au sein du biofilm.

5. Avantages du système biofilm

Du fait de sa structuration complexe, le développement sous forme de biofilm présente des avantages majeurs en termes de protection et d'accès aux nutriments pour la communauté microbienne qui le constitue. En effet, sous la forme de biofilm, les microorganismes présentent une plus faible sensibilité aux agressions environnementales comme la dessiccation, les actions chimiques, la chaleur et les antibiotiques.

La formation de la matrice joue un rôle majeur dans la lutte contre la dessiccation en maintenant une hydratation constante au sein du biofilm. En effet, des études ont montré une importante

baisse de la viabilité cellulaire après un assèchement pour des cellules planctoniques alors que des cellules présentes en biofilm conservaient quant à elles une viabilité stable (Tamaru et al., 2006 ; Knowles and Castenholz., 2008). Cette hydratation vient du caractère hydrophile de certains EPS qui favorise la création d'un gel hydraté autour des cellules limitant ainsi les pertes hydriques (Pereira et al., 2009) L'eau présente dans l'environnement du biofilm peut former des liaisons hydrogènes avec les EPS hydrophiles rendant ainsi la matrice riche en eau. Ces EPS hydrophiles sont le plus souvent des polysaccharides amphiphiles. Cependant cette tolérance à la dessiccation n'est pas illimitée, le prolongement excessif d'un assèchement dans un environnement sec se traduira par une rupture des liaisons hydrogènes et une perte hydrique. En lien avec la dessiccation, des résistances aux fortes températures ont également pu être attribuées aux biofilms particulièrement chez *Escherichia coli* (Ma et al. 2021 ; Stanford et al., 2021). Les EPS constituant la matrice servent alors d'isolants thermiques et seules les cellules situées aux extrémités du biofilms sont impactées (Fig. 4).

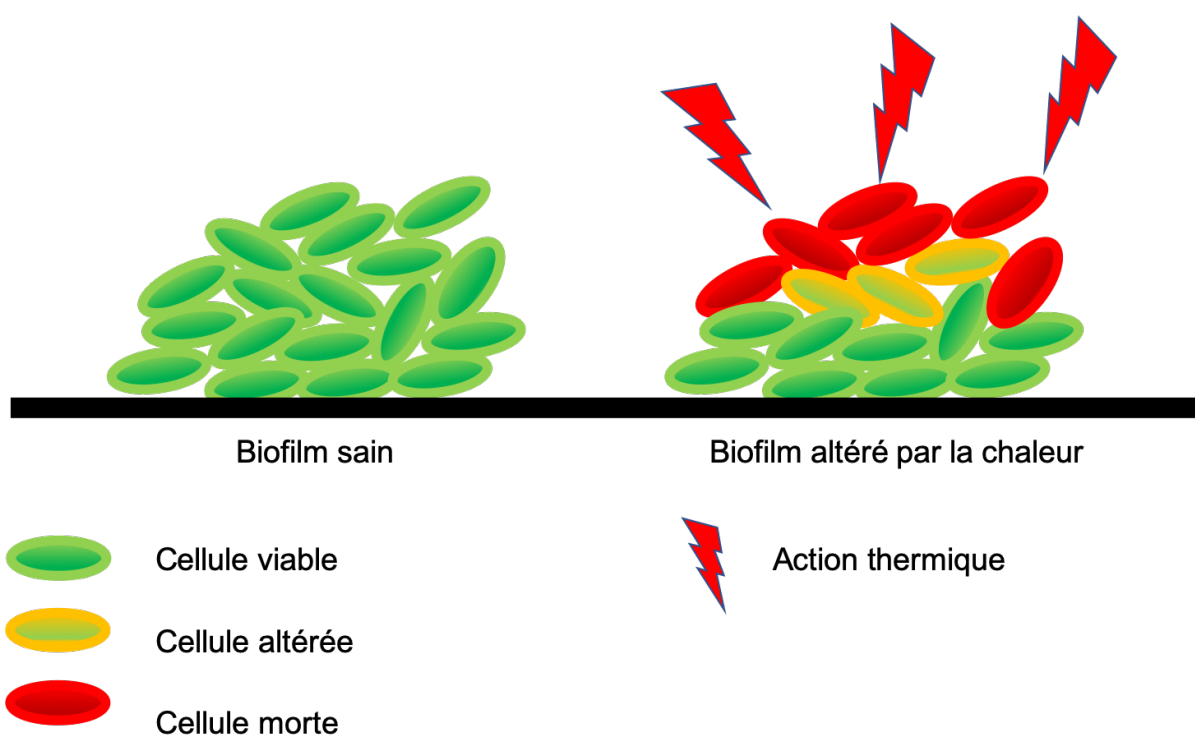


Figure 4 : Impact d'une exposition à de forte température sur un biofilm

Les microorganismes au sein d'un biofilm ont également l'avantage de présenter une résistance plus importante aux actions chimiques et notamment aux antibiotiques (Cepas et al., 2019 ; Abebe., 2020). Il a ainsi été montré chez certaines bactéries comme *Staphylococcus aureus* que la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est environ 50 000 fois supérieures à la CMI de cellules planctoniques (Suci et al., 1994 ; Marquès et al., 2015). Plusieurs facteurs ont ainsi pu être identifiés comme responsable de cette résistance : (i) effet bouclier de la matrice sur la

pénétration des antibiotiques, (ii) interaction des antibiotiques avec la matrice réduisant leur activité, (iii) action enzymatique comme la β -lactamase, (iv) changement d'activité métabolique au sein du biofilm, (v) changement génétique des cellules cibles ou modification des sites d'action et (vi) excrétion des antibiotiques via des pompes à efflux (Ito et al., 2009 ; Høiby et al., 2010 ; Abebe., 2020). Ainsi, cette nature multifactorielle dans les facteurs de résistance aux antibiotiques impose de grands défis pour l'utilisation des antimicrobiens conventionnels.

6. Les biofilms dans le domaine médicale

Le domaine médical ne fait pas exception dans la présence de biofilms microbiens. En effet il est possible de retrouver un certain nombre d'articles scientifiques relatant la présence de biofilms associés au corps humain et à ses affections.

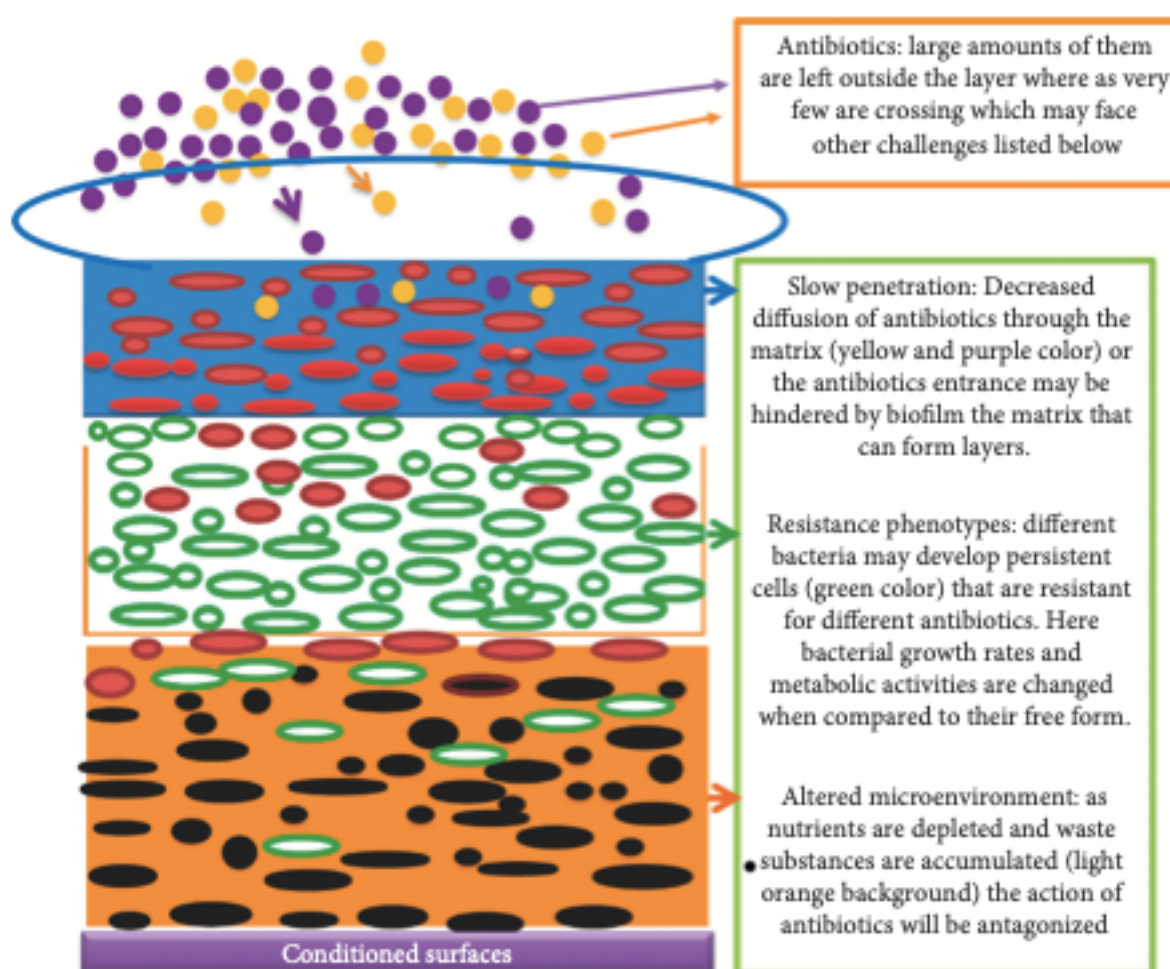


Figure 5 : Représentation schématique d'un biofilm mature avec différents mécanismes de résistance (Abebe., 2020)

6.1. Les biofilms bactériens

Les biofilms bactériens sont dans la plupart des cas néfastes et présentent une pathogénicité pour l'hôte qui les abrite à l'exception de rares spécificités. Le microbiote intestinal composé de bactéries commensales s'organise principalement sous la forme de biofilm à la surface de la paroi des intestins (Xu et al., 2022). Il joue un rôle majeur dans la dégradation des aliments en facilitant l'absorption de ceux-ci (Macfarlane and Dillon., 2007). Cependant, une déstabilisation de ce biofilm commensal peut avoir lieu par des bactéries pathogènes comme *Enterococcus* et bouleverser l'homéostasie intestinale et induire une infection pour l'hôte. Le microbiote de la peau présent sous forme de biofilm est lui aussi bénéfique en servant de barrière contre les attaques extérieures (chimique, UV, biologiques) (Scalise et al., 2015 ; Brandwein et al., 2016). Tout comme pour le microbiote intestinal, le microbiote cutané peut être altéré et des bactéries pathogènes peuvent s'y développer et entraîner des infections cutanées nécessitant une prise en charge médicale.

Les prises en charge relatives aux infections bactériennes sont dans la plupart des cas associées à la présence de biofilm et représentent près de 80% des infections chroniques et infections dues à du matériel médical (Hall-Stoodley et al., 2004 ; Floyd et al., 2017 ; Olivia et al., 2021). Les responsables de ces infections sont dans la majorité des cas des bactéries Gram positif appartenant principalement aux genres *Staphylococcus* et *Enterococcus* du fait de leur résistance accrue aux antibiotiques et une pathogénicité importante lorsque celles-ci sont présentes sous la forme de biofilm (Kaye et al., 2019 ; Olivia et al., 2021). Concernant *Staphylococcus*, l'espèce la plus pathogène est *S. aureus*. Elle se retrouve principalement associée aux infections cutanées et contaminations de matériels médicaux (cathéters, prothèses...) alors que chez *Enterococcus* il s'agit de *E. faecalis* responsable du plus grand nombre d'infections nosocomiales au monde (Tong et al., 2015 ; Olivia et al., 2021). Ces infections ont pour origine principale l'environnement chirurgical où le pathogène va s'introduire sur le site chirurgical et pouvoir ainsi s'y développer (Zimmerli et al., 2004). Il est alors possible de retrouver les différentes étapes de formation d'un biofilm. Les cellules planctoniques vont ainsi venir s'adhérer sur les implants et tissus sains induisant la première étape de contamination (Berne et al. 2015). Ces adhésions sont régies par une grande variété de récepteurs protéiques présents à la surface des tissus de l'hôte (Sava et al., 2010). La maturation du biofilm s'initie lorsque l'adhésion des cellules à la surface des tissus contaminés est irréversible ainsi la production de matrice peut être induite. A ce stade, le biofilm précoce est encore sensible au système immunitaire. Un biofilm mature va pouvoir induire une infection

chronique qui peut mettre des mois voire des années avant d'être perceptible par des symptômes cliniques. Le symptôme principal se caractérise par une inflammation locale et persistance de la zone contaminée (Olivia et al., 2021).

Il existe 3 modes d'action afin de lutter contre ces biofilms pathogènes. Le premier mode d'action consiste en une antibiothérapie préventive à la suite d'une intervention chirurgicale afin de restreindre l'adhésion des cellules planctoniques qui présentent une sensibilité plus importante aux antibiotiques (Abad et al., 2020). Le deuxième mode d'action a lieu à la suite d'une identification précoce d'une infection et nécessite un débridement cellulaire de la zone infectée et une antibiothérapie spécifique à l'espèce contaminante. Enfin, le troisième mode d'action se met en place lorsque le biofilm est installé et que l'infection est importante. Il consiste en un débridement sévère et un retrait de la prothèse contaminée. Il s'accompagne d'une antibiothérapie agressive et spécifique (Di Pilato et al., 2020 ; Olivia et al., 2021). Ces utilisations d'antibiotiques à répétition induisent des résistances rendant la lutte contre ses bactéries de plus en plus compliquée. Afin de limiter ces résistances, l'utilisation de plusieurs antibiotiques spécifiques avec des actions différentes est préconisée (Olivia et al., 2021).

6.2. Les biofilms levuriens

Il est possible de rencontrer des levures dans différents environnements dont le corps humain. En effet, les levures font parties du microbiote humain commensal en faible quantité mais jouent un rôle dans l'équilibre de celui-ci (Huffnagle and Noverr., 2013 ; Raut et al., 2017). Cependant, ces levures du microbiote commensal peuvent également induire, du fait de leur pathogénicité, des infections superficielles voire importantes pour l'hôte associé (Raut et al., 2017). Il a été identifié que plus de 300 espèces fongiques sont responsables d'infections ou de maladies mais que seulement quelques espèces de levures sont impliquées. Par ailleurs, cela représente environ 1,2 milliard de personnes infectées par des levures chaque année dont environ 200 millions de morts à la suite de complications causées par les biofilms associés à celles-ci (Brown et al., 2012). Dans la plupart des cas, ces infections causées par des levures du genre *Candida*, *Cryptococcus* et *Histoplasma* sont minimes et se caractérisent par des infections de peau et des mycoses dont le traitement aux antibiotiques se révèle être efficace (Denning and Bromley., 2015).

Ces levures pathogènes présentent la particularité d'être dimorphiques dans la nature et de passer de leur forme classique à une forme filamenteuse. Ce dimorphisme est caractéristique de *Candida albicans*, et plus particulièrement lors de la formation de biofilm par celle-ci. *C. albicans* présente la particularité d'être l'espèce la plus rencontrée lors d'infections par des levures et est responsable de candidose ainsi que d'autres maladies associées à sa virulence comme les endocardites (Raut et al., 2017). Les infections par *Candida* sont rencontrées majoritairement chez des personnes immunodéprimées, cancéreuses, diabétiques ainsi que sous thérapie antibiotique à long terme (Polvi et al., 2015). Elle est également la troisième cause d'infection via des cathéters médicaux (Desai et al., 2014). La facilité à la formation de biofilm structuré par *C. albicans* en fait un modèle type pour l'étude de la formation de biofilm par les levures pathogènes. En effet, *C. albicans* est capable de former des biofilms sur des surfaces humides, des muqueuses ainsi que sur des prothèses médicales (Fig. 6) (Cuellar-Cruz et al., 2012).

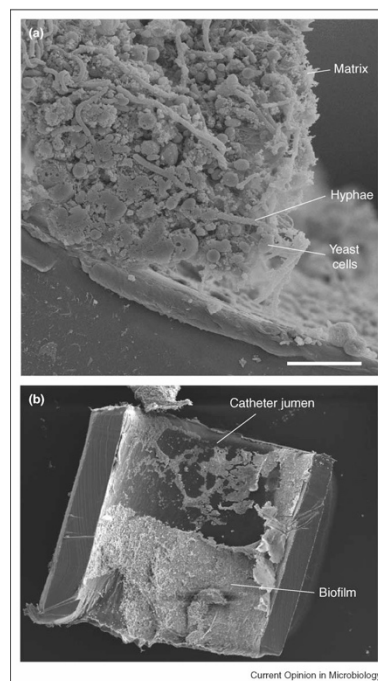


Figure 6 : Biofilm de *Candida albicans* associé à un cathéter médical (Nett and Andes., 2006)

Les biofilms de *Candida albicans* ne sont pas juste des agrégats cellulaires mais des structures hétérogènes développées par des cellules interagissant en communauté (Nickerson et al., 2006). Il est possible d'identifier 3 stades de formation d'un biofilm chez cette espèce (Chandra et al., 2001). Un stade précoce durant les 6 premières heures de croissance. Il se caractérise par une adhésion des cellules sur une surface (0/2h) puis la formation de microcolonies et un changement physiologique pour certaines cellules qui se différencient en cellules filamenteuses

(3/6h). Ensuite, vient le stade intermédiaire (6/18h) où une forte croissance cellulaire a lieu augmentant ainsi la densité de cellules et formant plusieurs couches. Durant ce stade, des cellules subissent une élongation et des cellules filamenteuses se forment. Enfin, le dernier stade, la maturation (18/48h) où plusieurs couches de cellules sont présentes et initient la production de matrice extracellulaire. Cette matrice associée aux cellules donne un aspect tridimensionnel au biofilm. Une fois le biofilm mûr, un éventuel quatrième stade peut avoir lieu où des parties du biofilms se décrochent et se dispersent afin de coloniser de nouvelles surfaces (Raut et al., 2014). Ces biofilms de *C. albicans* comme ceux rencontrés chez *S. aureus* présentent des résistances aux antibiotiques étant donné leur structure et la présence de cellules spécifiques sur lesquelles l'action des antibiotiques est réduite (Brilhante et al., 2015). Une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu lors de la formation et la régulation du biofilm peuvent fournir des indices pour le développement de stratégies limitant la formation de ces biofilms ainsi que dans le traitement des infections liées aux levures (Raut et al., 2017).

7. Les biofilms dans l'industrie agroalimentaire

Du fait de la diversité d'environnement dans laquelle il est possible de rencontrer des levures, le domaine agroalimentaire n'en fait pas exception et il s'avère que des biofilms y sont aussi observés (Zara et al., 2020). En effet, il est possible de rencontrer des levures sur des produits transformés comme des sirops, jus, produits laitiers ou soit directement sur des produits frais comme les fruits, légumes, miels (Deák et al., 1991 ; Zara et al., 2020). Ces levures peuvent avoir un impact positif sur le produit final en participant à la transformation de celui-ci ou au contraire être néfastes en dégradant ses qualités organoleptiques.

7.1. Aspects positifs des biofilms en agroalimentaire

L'étude des biofilms de levures dans l'agroalimentaire rapporte très peu d'effets positifs de leur présence sur le produit en cours de transformation à l'exception de rare cas (Tab. 1). Il s'avère que la fermentation des olives de table fait intervenir des levures dont le rôle majeur est de réduire l'amertume du fruit via une enzyme β -glucosidase ainsi qu'une dégradation de l'acide phytique par le biais d'enzymes phytases. Ces actions sont dans la plupart des cas réalisées par *Candida boidinii* qui est capable de former en association avec des bactéries lactiques des biofilms à la surface des olives (Benitez-Cabello et al., 2015 ; Zara et al., 2020). *Candida spp.* et *Pichia spp.* sous forme de biofilm sont également observées lors du processus de fabrication de l'huile d'olive et apportent une contribution positive durant fermentation et

maturation du produit (Santona et al., 2018 ; Porru et al., 2018). Cependant la présence d'agrégats de levures au sein de l'huile d'olive finie n'est pas souhaitée.

Lors de la fabrication de boissons fermentées, les levures jouent un rôle central dans l'élaboration de celles-ci mais la présence de biofilm n'est que très peu recommandée. Le Kombucha fait partie de ces rares exceptions. Il est issu de la fermentation du thé par un consortium de microorganismes symbiotiques se trouvant sous forme d'un biofilm à l'interface air-liquide appelé SCOBY (Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast). Il se compose de bactéries lactiques (*Lactobacillus spp.*), bactéries acétiques (*Komagataeibacter spp.*) ainsi que de levures (*Brettanomyces spp.*, *Zygosaccharomyces spp.*, *Stramerella spp.*, *Saccharomyces spp.*) (Coton et al., 2017 ; Harrison and Curtin., 2021 ; Mas et al., 2022). La présence de biofilm dans l'élaboration de certains vins (type vins de voile) est souhaitée afin de favoriser la production d'arômes responsables de la typicité sensorielle (partie 1 8.3.)

La production de produits laitiers fait également intervenir certaines levures dont quelques-unes se retrouvent sous forme de biofilm. *Kluyveromyces marxianus* est ainsi identifiée sous la forme de biofilm dans le lait de chèvre tout comme à la surface de certains fromages apportant une protection extérieure au cours de l'affinage de ceux-ci (Perpertuini et al., 2018 ; Zara et al., 2020). Il est également possible de rencontrer des biofilms de levures au sein d'usines de transformation de produits laitiers et plus particulièrement au sein des zones de récupération des eaux de lavage. Ces levures peuvent ainsi former des biofilms approvisionnés en nutriment lors d'écoulements d'eaux et servir de protection contre des pathogènes par occupation de la niche (Schön et al., 2016 ; Zara et al., 2020). Cependant cette présence de biofilm peut être contestée car le risque que des pathogènes s'y associent est grand et une contamination des produits en cours de transformation est alors possible.

Tableau 1 : Impact de la présence de biofilm de levure dans l'industrie agroalimentaire

	Impact positif	Impact négatif	Références
Fermentation des olives	<i>Candida boidinii</i>		Porru et al., 2018
			Camiolo et al., 2017
Vin	Levures de voile (<i>S. cerevisiae</i>)	<i>Candida vini</i>	
		<i>Pichia membranifaciens</i>	Legras et al., 2016
		<i>Hansenula polymorpha</i>	Fugelsang and Edwards., 2007
		<i>Brettanomyces. bruxellensis</i>	David-Vaizant and Alexandre., 2018
		<i>Saccharomyces ludwigii</i>	
		<i>Zygosaccharomyces. bailii</i>	
Bière		<i>Schizosaccharomyces. pombe</i>	
		<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	
		<i>Brettanomyces anomala</i>	Laitila et al., 2011
		<i>Candida krusei</i>	Storgards et al., 2006
Kombucha		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	
	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>		
	<i>Zygosaccharomyces spp</i>		Harrisson and Curtin., 2021
Produits laitiers		<i>Saccharomyces spp</i>	
		<i>Debaryomyces hansenii</i>	Perpetuini et al., 2019
	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Saccharomyces unisporus</i>	Schön et al., 2016
Jus de fruits		<i>Sporopachydermia lactativora</i>	Vitzilaiou et al., 2019
		<i>Candida krusei</i>	
		<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	Salo and Wirtanen., 2005
		<i>Pichia spp.</i>	Brugnoni et al., 2014
		<i>Rhodotorula spp</i>	

7.2. Aspects négatifs des biofilms en agroalimentaire

Les biofilms de levures dans le domaine agroalimentaire ne présentent pas que des aspects positifs, bien au contraire. Les biofilms en agroalimentaire constituent la première source de contamination des chaînes de production du fait de mesures d'hygiène inadéquates favorisant la formation et la persistance de biofilm. L'humidité ambiante est également favorable à la formation de biofilm (Snyder and Worobo., 2018 ; Zara et al., 2020). Les zones d'évacuation d'eau au sol représentent un fort foyer d'installation du fait d'écoulement d'eau et peuvent être constitués de levures. La présence de ces biofilms engendre d'importantes pertes économiques chaque année de l'ordre de plusieurs milliards de dollars du fait de pertes, consommation énergétique et la consommation excessive de produits de nettoyage (Srey et al. 2013). Les levures telles que *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Debaryomyces hansenii* et

Rhodotorula mucilaginosa sont fréquemment rencontrées sous la forme de biofilm en agroalimentaire et impactent les denrées en cours de production (Salo and Wirtanen., 2005 ; Zara et al., 2020). Ces levures sous forme de biofilm sont beaucoup plus difficiles à éliminer que lorsqu'elles se trouvent sous leur forme planctonique (Brugnoni et al., 2007).

Si l'on s'intéresse à la production de produits laitiers, il s'avère que les systèmes de récupération d'eau et de filtration sont régulièrement contaminés par des biofilms pouvant être constitués de levures du fait d'un écoulement d'eau régulier et un accès à des nutriments facilité par les eaux de lavage. Ces biofilms sont majoritairement composés de bactéries comme *Lactobacillus kefiranofaciens* et *Streptococcus thermophilus* et de levures comme *Debaryomyces hansenii* et *Saccharomyces unisporus* (Schön et al., 2016). Les filtres d'osmose inverse sont eux-aussi confrontés à des contaminations par des biofilms se formant au niveau des membranes de filtration. Ces biofilms se composent dans la plupart des cas de *Sporopachydermia lactativora* associée à des champignons filamenteux et des bactéries Gram négatif.

Le domaine brassicole est lui aussi enclin à des contaminations par des biofilms de levures. Il consiste en une colonisation des parois de cuve en association la plupart du temps avec des bactéries et champignons filamenteux (Gattlen et al., 2011). Ces contaminations se produisent préférentiellement dans le cas de bières sans alcool ou associées à d'autres boissons. Cette production de biofilm est rendue possible du fait d'un pH bas et une forte concentration en sucre favorisant ainsi les premières étapes de bioadhésion. *Wickerhamomyces anomalus* et *Saccharomyces diastaticus* sont identifiées comme étant les plus à risque de former des biofilms dans la bière et de ce fait, impacter la qualité visuelle et organoleptique de la bière (Timke et al., 2008 ; Laitila et al., 2011 ; Suiker and Wösten., 2022). De plus, d'autres levures du genre *Brettanomyces* sont également capables de former des biofilms dans la bière. La présence de ces levures se traduit par une turbidité importante, une forte diminution de la concentration en composé glucidique et la production de composés phénoliques. La lutte vis-à-vis de ces biofilms est complexe du fait de résistances aux solutions de désinfection notamment pour *B. anomala* qui résiste à de forte concentration en NaOH (Zara et al., 2020).

Ces biofilms étant tenaces et difficiles à éliminer, beaucoup d'efforts sont mis en jeu afin de développer de nouvelles approches de lutte comme l'utilisation d'agents antimicrobiens naturels inhibant leur dispersion (Zara et al., 2020).

8. Les biofilms en œnologie

L'œnologie ne fait pas exception en termes de présence de biofilms (Sidari et al., 2014 ; Tek et al., 2018). A la surface de la baie de raisin, le microbiote est constitué d'espèces fongiques,

levures et bactéries qui s'organisent sous la forme d'un biofilm (Renouf et al., 2005, 2007). La présence de biofilm est avérée tout au long de l'itinéraire de vinification avec un impact pouvant être positif ou négatif selon les microorganismes qui le composent. Dans le domaine œnologique, il est possible de rencontrer une grande diversité de microorganismes comme des levures, bactéries et champignons. Ce microbiote associé au raisin évolue tout au long de la fermentation selon les propriétés physico-chimiques. Les biofilms ainsi formés peuvent induire une persistance du microorganisme dans le vin. Depuis le début des années 1990, des études ont été initiées afin de comprendre ces différents biofilms (Gosset et al., 2022).

8.1. Les itinéraires de vinification

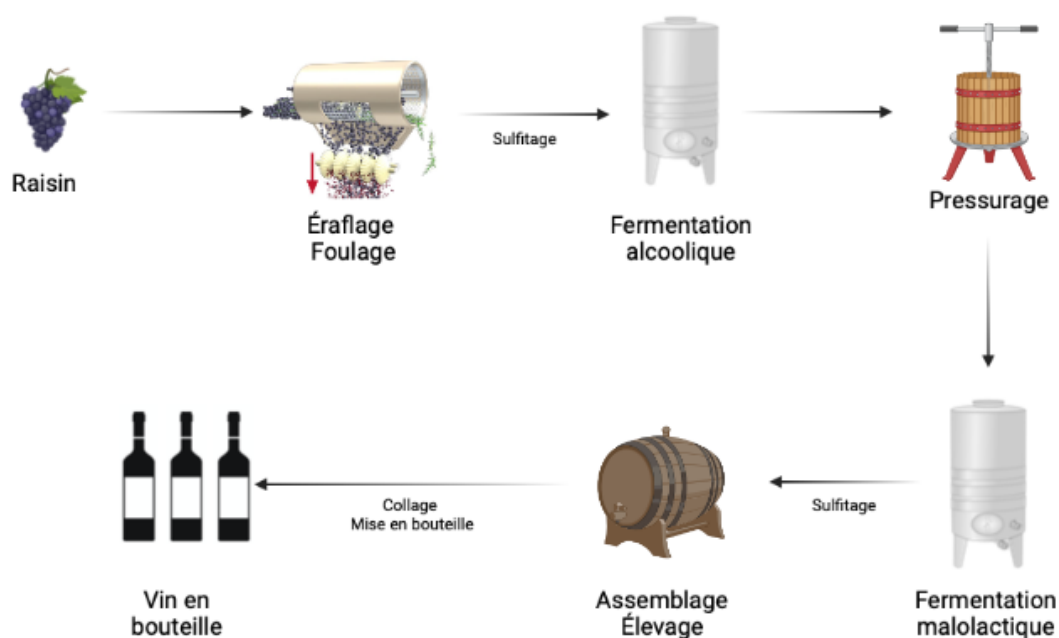


Figure 7 : Itinéraire de vinification des vins rouges

L'élaboration d'un vin est un processus long faisant intervenir de nombreuses étapes entre le moment où le raisin est ramassé et celui où le vin est mis en bouteille. Selon les appellations et propriétés vitivinicoles, les itinéraires techniques diffèrent afin d'obtenir des vins originaux qui leurs sont propres. La figure 7 représente un exemple d'itinéraire de vinification classiquement mis en œuvre.

Le raisin ayant atteint sa maturité est vendangé puis transporté à la cave. Celui-ci va subir une étape d'éraflage afin de séparer les baies de la rafle. Les baies sont ensuite foulées dans le but de rompre la pellicule et libérer le jus (Ribéreau-Gayon et al., 2012). A ce stade, les baies peuvent subir un traitement au dioxyde de soufre (SO_2) dont la concentration varie de 30 à 80

mg/L. Ce traitement vise à protéger le moût vis-à-vis des phénomènes d'oxydation (action antioxydante et antioxydante) et du développement précoce des bactéries présentes à la surface des baies (action antimicrobienne). Le dioxyde de soufre favorise également la croissance et le développement des levures *S. cerevisiae*. Le moût est ensuite placé en cuve (cuve béton, inox ou foudre bois) où une étape de macération à froid peut être réalisée. Cette étape optionnelle permet d'effectuer une extraction en phase aqueuse des arômes et des composés phénoliques de la baie dans le but d'augmenter la couleur et les arômes dans le moût (Heridia et al., 2010 ; Cai et al., 2014).

L'étape préfermentaire est suivie de la fermentation alcoolique (FA) qui est le point central de la vinification. Les levures convertissent les sucres présents dans le moût de raisin en éthanol et dioxyde de carbone (CO₂) avec production de chaleur. Une macération des parties solides s'effectue simultanément permettant la dissolution des composés phénoliques et tannins responsables de la couleur et la structure du vin. Le moût avant fermentation est colonisé par des levures indigènes de types *Saccharomyces* ou Non-*Saccharomyces* (NS) (Renouf., 2006 ; Zott et al., 2008). Durant les premières heures, les NS sont prédominantes dans le moût puis *Saccharomyces cerevisiae* colonise rapidement la niche en devenant majoritaire. Un levurage à l'aide de Levures Sèches Actives (LSA) sélectionnées pour leurs qualités fermentaires et organoleptiques peut également être effectué permettant ainsi de limiter le développement de la population indigène et démarrer plus rapidement la fermentation. Au cours de la FA, les levures produisent un certain nombre de métabolites secondaires comme le glycérol, des acides gras et des esters qui ont un certain intérêt œnologique. Certains paramètres de fermentation (température, oxygène, azote) peuvent être régulés afin de limiter les risques d'arrêts de fermentation.

À la suite de la FA se produit une seconde fermentation appelée fermentation malolactique (FML). Cette FML est réalisée en cuve ou barrique par des bactéries lactiques et principalement appartenant à l'espèce *Oenococcus oeni* (Dicks et al., 1995). *O. oeni* va transformer l'acide L-malique en acide L-lactique (Lonvaud-Funel., 1999). Cette décarboxylation va entraîner une désacidification du vin améliorant les qualités gustatives. *O. oeni* du fait de sa présence va également réduire la concentration des nutriments présents dans le vin apportant ainsi une certaine stabilité microbienne. La FML est une étape pouvant être difficile à maîtriser selon les paramètres physico-chimiques du vin. Une fois la totalité de l'acide malique transformée en acide lactique, le sulfitage est réalisé afin de stabiliser les vins d'un point de vue microbiologique limitant ainsi les altérations.

L'élevage est une étape importante qui se déroule à la suite des fermentations principalement en barrique et durant un temps relativement long pouvant aller jusqu'à 2 ans pour les grands vins. Cette étape permet aux arômes et à la couleur du vin d'évoluer sous l'effet de phénomènes d'oxydoréductions. Il se produit également un apport en arômes, en composés de la sucrosité et en tanins via le bois (Gammacurta et al., 2019). Une sédimentation des particules lourdes et des levures mortes (lies) va se produire puis les soutirages permettront de séparer le vin clair de ses dépôts. L'utilisation de barriques neuves va apporter un côté plus boisé au vin mais le risque de contamination microbienne est accentué du fait de la présence d'oxygène et de sucres résiduels du bois (Renouf., 2006).

La dernière étape de vinification consiste en une clarification et stabilisation des vins par des colles biologiques. Il se produit une floculation des particules lourdes responsables du trouble qui vont sédimenter au fond de la cuve (Ribéreau-Gayon., 1977 ; Mierczynska-Vasilev and Smith., 2015 ; Vernhet., 2019). Le vin peut ensuite être filtré afin d'éliminer les particules plus fines et surtout les éventuels microorganismes encore présents.

8.2. Les biofilms bactériens

Le vin est un environnement où l'on retrouve principalement deux types de bactéries. Les bactéries acétiques dont la présence n'est pas souhaitée du fait de leur capacité à produire de l'acide acétique et de l'acétate d'éthyle dans les vins et les bactéries lactiques dont la présence est nécessaire pour les vins pour lesquels la FML est souhaitée. Les biofilms de bactéries acétiques, dans la majorité des cas formés par *Acetobacter aceti*, sont connus pour se former à l'interface air-liquide et sont utilisés pour la production d'acide acétique (Halan et al., 2012). Par ailleurs leur présence dans le vin reste limitée et seulement quelques cas ont été observés chez *A. aceti* (Tristezza et al., 2010). Des interactions avec *Lactobacillus hilgardii* augmenteraient la capacité à former des biofilms chez *A. aceti* sans pour autant impacter *L. hilgardii* (Tristezza et al., 2010).

Concernant les bactéries lactiques, les travaux sur les biofilms se concentrent majoritairement sur *Oenococcus oeni* du fait de son intérêt pour la FML. La première observation d'un biofilm d'*O. oeni* remonte à 1991 (Janssen., 1991). Les biofilms de *O. oeni* présenteraient l'avantage d'effectuer une FML complète plus rapidement et de façon reproductible par rapport aux cellules planctoniques (Coelho et al., 2019 ; Gosset et al., 2022). Il a ainsi été montré dans du vin blanc que la transformation de l'acide malique en acide lactique se faisait 2 à 3 fois plus rapidement lorsque *O. oeni* se trouvait sous forme de biofilm. Ces biofilms seraient également capables de moduler le profil aromatique du vin lorsque de la FML est réalisée en barrique en

diminuant ou augmentant certains composés aromatiques provenant du bois (Bastard et al., 2016). Le biofilm agirait donc comme une barrière perméable (Dunne., 2002) où les composés aromatiques y seraient adsorbés ou convertis par des enzymes présentes au sein de la matrice. Cette hypothèse a pu également être vérifiée sur les composés issus du raisin (polyphénols) et de la fermentation (alcools supérieurs). En effet, lorsque *O. oeni* est présente sous forme de biofilm, il a été montré une diminution de la concentration de ces différentes molécules (Coelho et al., 2019). Dans les cas où la FML n'est pas souhaitée, la présence de *O. oeni* est problématique, d'autant plus si elle se trouve sous forme de biofilms du fait de la résistance impliquée par ce mode de vie. Il est alors nécessaire de sulfiter le vin en fin de FA afin de limiter la présence et la formation de biofilm par *O. oeni*. L'action de bactériocines serait également un moyen de lutte efficace contre les biofilms de *O. oeni* (Gosset et al., 2022).

D'autres bactéries lactiques sont également capables de former des biofilms comme *Lactiplantibacillus plantarum*. Chez cette espèce, la capacité à former du biofilm est souche dépendante. Par ailleurs, sous forme de biofilm, *L. plantarum* présenterait plus de résistance aux conditions stressantes du vin (pH, éthanol) et permettrait une conversion totale de l'acide malique de façon plus rapide (Kubota et al., 2008 ; Pannella et al., 2020).

8.3. Les biofilms levuriens

Dans le domaine œnologique, les levures occupent une place centrale du fait de leur capacité fermentaire. Ces levures se rencontrent du vignoble au vin fini et peuvent selon l'espèce former des biofilms ayant soit des effets positifs sur le vin (qualité aromatique, fermentaire), soit des effets négatifs (dépréciations organoleptiques).

8.3.1. Les biofilms chez *Saccharomyces cerevisiae*

Les premières observations de biofilm chez *Saccharomyces cerevisiae* remontent à 2001. Elles se caractérisaient par des agrégats de cellules adhérentes sur du plastique en conditions pauvre en glucose (Renolds and Fink., 2001). En œnologie, *S. cerevisiae* présente des capacités de bioadhésion sur de nombreuses surfaces solides comme l'acier inoxydable, le bois, le polystyrène mais également la baie de raisin (Sidari et al., 2014 ; Abdo et al., 2020). Cette capacité de bioadhésion pourrait expliquer en partie la persistance des levures dans l'environnement du vignoble et de la cave. Les biofilms de *S. cerevisiae* naturellement formés sur des surfaces solides ont été peu étudiés sans doute du fait qu'ils ne présentent aucun effet sur les caractéristiques finales du vin (Gosset et al., 2022). Néanmoins, ils doivent probablement contribuer à la rémanence à la cave de *S. cerevisiae* et à l'inoculation spontanée du moût de

raisin lors de la campagne de vendange. *S. cerevisiae* s'avère néanmoins être un bon modèle d'étude concernant les biofilms de levures sur des surfaces solides.



Figure 8 : Biofilm vin-air formé par des levures de voile

Biofilm vin-air formé par des levures de voile La formation de biofilm à l'interface air-vin est identifiée chez certaines souches de *S. cerevisiae* et porte le nom de levures de voile (Fig.8) (Carbenero-Pacheco et al., 2022). Ces levures sont spécifiquement utilisées dans l'élaboration de certains vins du sud de l'Espagne (Sherry, Xeres, Montilla-Moriles), de l'est de la France (vin jaune du Jura), d'Hongrie et d'Italie (Gosset et al., 2022). Il s'agit de vins blancs dont le profil aromatique est associé à la formation de ce biofilm à l'interface air-vin au cours de l'élevage (Zara et al., 2005). Ce biofilm se forme à la suite des fermentations alcooliques et malolactiques lorsque les concentrations en azote assimilable et sources carbonées sont limitées et la concentration en éthanol est importante (Moreno-Garcia et al., 2013). Ce stress oxydatif va déclencher l'activation de voies métaboliques spécifiques, régulées par la transcription des gènes de la famille *FLO* et plus particulièrement *FLO11* (Alexandre et al., 2013 ; Legras et al., 2016). Le gène *FLO11* va coder pour une protéine membranaire FLO11p qui va augmenter l'hydrophobicité de la surface de la cellule et par la même occasion induire des agrégats de cellules. Ces agrégats au contact de bulles de dioxyde de carbone vont pouvoir remonter à la surface et s'adhérer les uns avec les autres formant ainsi un film perméable à la surface du vin. Les cellules du fait d'un manque de sources carbonées et un contact avec l'oxygène vont passer d'un métabolisme fermentaire à un métabolisme oxydatif permettant l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde et acétate. Ce métabolisme respiratoire spécifique permet aux vins d'acquérir leurs spécificités aromatiques (Martinez et al., 1998 ; Carbonero-Garcia et al., 2022).

8.3.2. Les biofilms chez les levures non-*Saccharomyces*

Saccharomyces cerevisiae est la levure majoritairement rencontrée lors du processus de vinification. Cependant, il est possible de trouver un certain nombre d'autres espèces qualifiées de Non-*Saccharomyces* (NS). Ces levures se trouvant dans l'environnement de vinification peuvent avoir des effets bénéfiques comme *Starmerella bacillaris* qui participe à la bioprotection contre d'autres microorganismes pathogènes et à la production de composés aromatiques (Englezos et al., 2019 ; Nadai et al., 2021). Cette espèce montre des capacités de bioadhésion sur polystyrène et acier inoxydable en fonction des souches (Perpetuini et al., 2021). Par ailleurs, il est également possible de trouver des levures NS comme *Pichia manshurica*, *Pichia membranifaciens*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida guilliermondii* et *Trichosporon asahii* (Carbonero-Pacheco et al., 2022). Leurs présences ne présentent pas d'impacts directs sur les caractéristiques organoleptiques du vin mais des faibles variations de pH et d'acidité totale peuvent être perçues.

Une grande majorité des levures NS retrouvées dans l'environnement de vinification présentent des effets négatifs sur le vin (composé aromatique, sédimentation, refermentation...). Ces levures appartenant principalement aux genres *Pichia*, *Hansenula*, *Candida* et *Brettanomyces* sont capables de former des biofilms à l'interface air-vin. Ces derniers vont impacter les caractéristiques chimiques et sensorielles des vins de la même façon que les levures de voile et oxyder l'éthanol en acétaldéhyde et acides volatiles engendrant une dépréciation organoleptique des vins contaminés (Loureiro and Malfeito-Ferreira., 2003). D'autres espèces comme *Saccharomyces ludwigii*, *Zygosaccharomyces bailii* et *Schizosaccharomyces pombe* peuvent elles aussi former des biofilms à l'interface air-vin et induire la production de gaz, sédimentation et trouble dans le vin (David-Vaizant and Alexandre., 2018)

Les levures non-*Saccharomyces* présentent également la capacité de former des biofilms sur des surfaces solides comme le bois, l'acier inoxydable et le polystyrène. Ces biofilms montrent une meilleure résistance aux agents de nettoyage et de désinfection que les cellules planctoniques des mêmes espèces. Il semblerait cependant que l'action de solutions alcalines à base de chlore seraient létales pour la plupart des biofilms (Tristezza et al., 2010). Ils sont formés majoritairement par *S. ludwigii*, *S. pombe*, *Z. bailii* et *Brettanomyces bruxellensis* (Tristezza et al., 2010). L'espèce la plus étudiée pour ses capacités de bioadhésion est sans doute *B. bruxellensis*. En effet, cette levure est impliquée dans l'altération des vins rouges et est capable de croître dans des milieux pauvres en nutriments (Chatonnet et al., 1992). Des études ont ainsi pu confirmer les capacités de bioadhésion et de formation de biofilm de cette

espèce sur différents supports et différents milieux ne prenant en compte un nombre restreint d'individus (Joseph et al., 2007 ; Lebleux et al., 2020 ; Dimopoulou et al., 2021).

Partie 2. *Brettanomyces bruxellensis*

1. Histoire et origines

Les levures du genre *Brettanomyces* ont une origine étymologique liée à la Grande Bretagne du fait que la première observation fût réalisée dans une « English Stock Beer ». Ce nom *Brettanomyces* provient respectivement des mots grecs « *Brettano* » et « *myces* » pour « British brewer » et champignon (Steensels et al., 2015 ; Smith and Divol., 2016). Claussen a été le premier en 1904 à l'observer dans une bière en cours de refermentation. Avant de se distinguer comme un genre de levure, elle a été associée au genre *Torulasporea*. En 1921, une levure présentant les mêmes caractéristiques a été isolée dans une bière lambic belge de la vallée de la Senne proche de Bruxelles. Celle-ci fût nommée *Brettanomyces bruxellensis* en 1940 par Custers (Custers et al., 1940). Elle a également été isolée pour la première fois d'un moût de raisin allemand en 1933 et nommée *Mycotorula intermedia*. Au cours des années 1950, des levures similaires ont été décrites sous le nom de *Brettanomyces vini* dans les vins français ainsi que sur le matériel vinaire et l'environnement du chai engendrant de nombreuses investigations des zones potentiellement contaminables (Barret et al., 1955 ; Peynaud and Dumercq., 1956 ; Peynaud., 1959, Fugelsang., 1998 ; Connell et al., 2002). Entre les années 1960 et 1980, des levures du genre *Brettanomyces* ont ainsi pu être découvertes et décrites dans de nombreux pays producteurs de vin comme l'Afrique du Sud, l'Italie, l'Australie et la Nouvelle-Zélande (Smith and Divol., 2016). Ces différentes espèces de *Brettanomyces* (*B. lambicus*, *intermedius*, *vini*, *schanderlii*, *claussenii* et *M. intermedia*) présentant des caractéristiques similaires ont été reclassifiées en 1990 comme appartenant toutes à l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* (Barnett et al., 1990). De nos jours, 5 espèces du genre de *Brettanomyces* sont référencées : *B. bruxellensis*, *B. nanus*, *B. anomala*, *B. curstersianus* et *B. naardensis* (Steensels et al. 2015 ; Smith and Divol., 2016). *Brettanomyces bruxellensis* a également été décrite dans d'autres produits issus de la fermentation comme le cidre, le kombucha, le bioéthanol, la téquila, la fermentation des olives, les produits laitiers et le kéfir.

Brettanomyces bruxellensis est une levure dite anamorphe se reproduisant de façon asexuée par bourgeonnement végétatif. Par ailleurs, une forme sexuée dite téléomorphe a pu être observée par Van der Walt et Van der Kerlen en 1960 nommée *Dekkera bruxellensis* et intégrée à la

dénomination de l'espèce en 1964 (Van der Walt., 1964). Il est alors possible de trouver les 2 noms dans la littérature. Les difficultés d'induction de la forme téléomorphe n'ont conduit à aucune autre observation référencée de cette forme depuis 1960 et les techniques d'identification moléculaire ne permettent pas une distinction des 2 formes (Loureiro and Malfieito-Ferreira., 2006. Oelofse et al., 2008). Ainsi selon le code international de la nomenclature des algues, champignons et plantes (Code de Melbourne) les champignons doivent être désignés sous un terme inique. De ce fait, le terme de *Brettanomyces bruxellensis* étant le plus couramment rencontré dans les procédés de fermentation, doit être privilégié à *Dekkera bruxellensis* pour la description de l'espèce (Steensels et al., 2015).

2. Besoins nutritionnels

2.1. Les sources carbonées

Brettanomyces bruxellensis est capable de métaboliser de nombreuses sources carbonées lui permettant ainsi de contaminer des milieux pauvres où d'autres levures ne survivraient pas. Les monosaccharides comme le glucose, le fructose et le mannose sont les sources de carbone les plus énergétiques pour *B. bruxellensis* (Steensels et al., 2015 ; Cibrario et al., 2020). Une spécificité est observée concernant le galactose qui est métabolisable selon la souche testée (Crauwels et al., 2015 ; Cibrario., 2020). *B. bruxellensis* présente à la différence de *S. cerevisiae* la capacité de dégrader les pentoses comme le ribose et l'arabinose lui apportant ainsi un avantage vis-à-vis d'autres levures (Crauwels et al., 2015). Les osides issus de la fermentation comme le tréhalose ou issus du bois comme le cellobiose présent en fin de FA et au cours de l'élevage sont également utilisés comme source carbonée (Cibrario et al., 2020). Certaines souches présentent la particularité d'utiliser l'éthanol comme seule source de carbone (Conterno et al., 2006 ; Smith and Divol., 2016). Cette dégradation de l'éthanol n'est cependant rendue possible qu'en condition aérobie via un métabolisme respiratoire (Steensels et al., 2015). Des polyols comme le glycérol, mannitol ou sorbitol sont également utilisés comme unique source de carbone par certaines souches en conditions aérobies.

Certains acides organiques comme l'acide lactique, l'acide malique, l'acide acétique peuvent eux aussi être dégradés en présence d'oxygène avec cependant un rendement énergétique plus faible qu'avec des monosaccharides (Conterno et al., 2006 ; Smith and Divol et al., 2016). Il est également décrit que certaines souches seraient capables de métaboliser des sucres complexes comme l'amidon, les pectines, les dextrines. (Galafassi et al., 2011 ; Crauwels et al., 2015). Les dextrines comme le maltotetraose et maltopentose sont des sucres résiduels présents

dans la bière en fin de fermentation. Ils sont hydrolysés par une α -glucosidase en unités de glucose pouvant être assimilées par *B. bruxellensis* (Kumara and Verachtert., 1991 ; Kumara et al., 1993 ; Steenels et al., 2015).

2.2. Assimilation de l'azote

La nutrition azotée est essentielle au bon fonctionnement cellulaire car l'azote est un élément clé dans la synthèse de constituants cellulaires comme les acides aminés, les nucléotides et les enzymes. L'azote présent dans l'environnement se retrouve sous différentes formes pouvant selon les conditions environnementales être métabolisables. En présence d'oxygène, *B. bruxellensis* présente de faible besoin en azote. Elle est capable d'utiliser les nitrates présents dans l'environnement comme seule source azotée contrairement à *S. cerevisiae* (de Barros Pita et al., 2013 ; Steenels et al., 2015 ; Smith and Divol., 2016). Cependant cette assimilation semble être souche-dépendante selon la niche d'origine (Conterno et al., 2006 ; Crauwels et al., 2014). Le nitrate présent dans l'environnement va pouvoir être assimilé et réduit en nitrite par une nitrate réductase qui sera à son tour réduit en ammonium par une nitrite réductase (Siverio., 2002). Cette assimilation des nitrates est très coûteuse énergiquement et a pour conséquence une diminution de la taille des cellules ainsi que de la production d'éthanol (Steenels et al., 2015). Cette capacité à assimiler les nitrates est un avantage pour l'implantation de *B. bruxellensis* dans l'industrie des bioéthanol du fait que la concentration en nitrate peut y être élevée. Cet avantage vis-à-vis de *S. cerevisiae* est stratégique dans cette industrie où le type et la disponibilité en azote sont déterminants dans le taux de réussite de la fermentation. En condition anaérobie, l'assimilation de nitrate comme seule source azotée conduit à une forte production d'acide acétique à partir du glucose ce qui n'est pas le cas lorsque d'autres sources d'azotes sont présentes (Steenels et al., 2015).

L'azote présent sous forme α -aminée est également une source d'assimilation (Smith and Divol., 2016 ; Parente et al., 2018). Il semble que la glutamine soit l'acide aminé préférentiellement assimilé par *B. bruxellensis*. Cette préférence dans l'assimilation des acides aminés est directement impactée par la disponibilité en oxygène (Parente et al., 2018). En effet, des acides aminés vont être privilégiés par rapport à d'autres selon que les cellules se trouvent en anaérobie ou aérobie (Tab. 2). Les auteurs ont ainsi classé les acides aminés selon leur ordre d'assimilation en présence ou non d'oxygène (Parente et al., 2018). Les acides aminés assimilés en seconde intention sont associés avec une diminution de la vitesse de croissance ainsi que du rendement cellulaire. Il est également important de noter que des concentrations

limitantes en azote sont impactantes sur la croissance de l'espèce et induisent une diminution de celle-ci tout comme des concentrations trop élevées (Aguilar-Uscanga et al., 2000).

Tableau 2 : Classification de acides aminés selon leur potentiel d'assimilation en présence ou non d'oxygène. D'après Parente et al., 2018

	Assimilation préférentielle	Assimilation secondaire	Assimilation limitée
Aérobic	Glutamine	Arginine, aspartate, glutamate, leucine, thréonine	Alanine, asparagine, cystéine, glycine, isoleucine, lysine, histidine, méthionine, phénylalanine, proline, sérine, tyrosine, tryptophane, valine
Anaérobic	Aspartate, Glutamate, glutamime	Alanine, arginine, asparagine, sérine, phénylalanine	Cystéine, glycine, isoleucine, leucine, lysine, histidine, méthionine, proline, thréonine, tryptophane, tyrosine, valine

2.3. Métabolisme des substrats carbonés

Brettanomyces bruxellensis est une levure capable de se développer que ce soit en présence ou en absence d'oxygène. On parle d'alors d'anaérobie facultative (Aguilar-Uscanga et al., 2003 ; Rozpedowska et al., 2011). Les hexoses présents dans l'environnement sont catabolisés en pyruvate par la voie de la glycolyse. Ces molécules de pyruvate produites vont ensuite être elles-mêmes catabolisées via les voies de la respiration et ou de la fermentation selon la présence ou non d'oxygène.

En aérobic, la production d'énergie s'effectue via le métabolisme respiratoire activé par l'oxygène présent. Le pyruvate issu de la glycolyse subit une décarboxylation oxydative par le complexe pyruvate déshydrogénase pour donner de l'acétyl-CoA. Cet acétyl-CoA va pouvoir entrer dans le cycle de Krebs et induire la formation d'ATP par les cofacteurs (NADH et FADH₂). Ce métabolisme respiratoire rend l'oxydation des hexoses complète et une production d'énergie maximale (38 ATP pour 1 hexose).

La levure peut également utiliser un métabolisme fermentaire en absence d'oxygène pour sa production d'énergie. Le pyruvate est décarboxylé en acétaldéhyde par une pyruvate décarboxylase puis réduit en éthanol avec l'oxydation du NADH. Cette réaction est moins énergétique car elle permet la production de seulement 2 ATP par hexose mais est suffisante pour la multiplication cellulaire.

En présence de fortes concentrations en sucres, *B. bruxellensis* va fermenter même en présence d'oxygène alors que le métabolisme respiratoire est possible (Steenels et al., 2015). Cet effet

appelé effet Crabtree est également observé chez *S. cerevisiae*. Il apporte un avantage à la levure en lui permettant de produire en première intention de l'éthanol afin de limiter la croissance d'autres microorganismes compétitifs puis lorsque les sucres sont épuisés, l'éthanol peut être consommé par le métabolisme respiratoire (Piskur et al., 2006).

Lors d'un passage en anaérobie, le métabolisme respiratoire est inactivé, *B. bruxellensis* n'est plus capable de réduire ses coenzymes et la glycolyse est elle aussi inhibée. Cet événement appelé effet Custer se traduit par une inhibition de la fermentation lors du passage en anaérobie du fait d'un déséquilibre d'oxydo-réduction dans la cellule (Custer., 1940 ; Scheffers., 1961). *B. bruxellensis* est sensible à cet effet comparé à *S. cerevisiae* qui est capable de restaurer son équilibre rapidement en produisant du glycérol en quantité importante (Rozpedowska et al., 2011). Cette inhibition est transitoire et se traduit par une phase de latence plus importante avant de produire à nouveau de l'éthanol.

3. Morphologie

Brettanomyces bruxellensis se caractérise par des morphologies relativement variables selon les souches, les conditions environnementales ainsi que l'état physiologique dans lequel elle se trouve (Renouf., 2015). Différentes formes peuvent être utilisées pour décrire l'espèce. Cependant, les termes principalement rencontrés sont : ovoïdale, ellipsoïdale, cylindrique, circulaire et allongée (Agnolucci et al., 2009, Smit., 2011 ; Louw et al., 2016). Étant présente sous la forme anamorphe, les cellules présentent à leur surface des cicatrices de bourgeonnement résultant de la multiplication cellulaire (Fig. 9) (Smith., 2011).

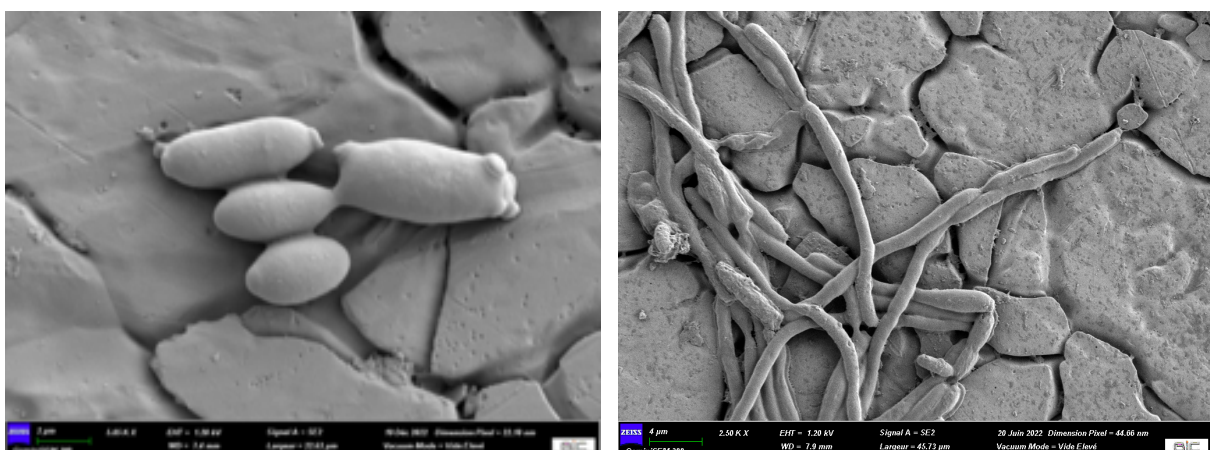


Figure 9 : Cellules de *B. bruxellensis* en cours de division cellulaire et présentant des cicatrices de bourgeonnement (gauche) et cellules pseudophyphales bioadhérées (droite) (production personnelle)

Il est également possible de rencontrer des formes particulières chez *B. bruxellensis* appelées pseudohyphes (Smith., 2011 ; Martyniak et al., 2017 ; Lebleux et al., 2020). Ces pseudohyphes

se caractérisent par une élongation cellulaire et la formation d'un filament multicellulaire pouvant présenter des ramifications (Cullen and Sprague., 2012 ; Song and Kumar., 2012). Cette morphologie spécifique a été peu décrite jusqu'à présent en prenant en compte la diversité de l'espèce. Chez d'autres levures comme *S. cerevisiae*, cette forme semble être induite lors d'un manque de nutriment ou un stress oxydatif. Chez *B. bruxellensis*, des études montrent que la présence de dioxyde de soufre SO₂ pourrait également induire cette morphogénèse (Vigentini et al., 2013 ; Louw et al., 2016).

L'observation de formes particulières appelées chlamyospore-likes a aussi pu être effectuée chez des cellules formant un biofilm (Lebleux et al., 2020). Ces formes se caractérisent comme étant des spores issues de la multiplication végétative. Ils se retrouvent également chez d'autres levures comme *C. albicans* où ils seraient impliqués dans la survie à long terme ou dans la résistance à l'immunité de l'hôte (Navarathna et al., 2016 ; Williams et al., 2022).

Cette grande diversité morphologique permet d'expliquer que la simple identification de l'espèce par microscopie n'est pas fiable. Cependant, l'utilisation d'outils d'apprentissage semble être prometteur pour l'identification du groupe génétique par microscopie optique (Lebleux et al., 2021).

4. Diversité génétique de l'espèce

Depuis le début des années 2000, le développement d'outils d'analyse moléculaire a permis de mettre en évidence une grande diversité intra-spécifique chez *B. bruxellensis*. Celle-ci présente un caryotype variable selon les souches, ce qui est peu commun au sein d'une même espèce où habituellement l'organisation chromosomique est conservée entre les individus. Le caryotype varie de 4 à 9 chromosomes dont la taille est comprise entre 1 et 6 Mbp (Hellborg and Piskur., 2009).

Les techniques de séquençage à haut-débit ont permis de donner des éléments de réponse sur la diversité génétique de l'espèce notamment sur la structure et l'organisation de cette diversité. En effet, il a ainsi été montré que *B. bruxellensis* se caractérise par un génome polyploïde, c'est-à-dire plus de 2 sets complets de chromosomes. Certaines souches présentent un génome diploïde (2n) et d'autres un génome triploïde (3n) (Curtin et al., 2012 ; Piskur et al. 2012 ; Borneman et al., 2014). Par ailleurs, la forme haploïde n'a pour l'heure jamais été observée, la reproduction sexuée étant extrêmement rare chez cette espèce (1 seule observation en 60 ans). L'état triploïde se caractérise par des cellules possédant un core génome diploïde ainsi qu'une copie d'un génome additionnel (Curtin et al., 2012, Borneman et al., 2014., Gounot et al., 2020). Cette copie additionnelle peut être génétiquement proche du core génome (< 1% de divergence)

ou être différente génétiquement ($> 3\%$ de divergence). On parlera alors respectivement d'autotriploïdie et d'allotriploïdie. Concernant les individus allotriploïdes, l'acquisition de la copie additionnelle serait la résultante un évènement d'hybridation interspécifique avec une espèce donneuse. Cette dernière ne semble pas appartenir au genre *Brettanomyces* du fait de divergence avec le core génome diploïde de plus de 23% (Harrouard et al., 2022). Borneman et al., (2014) ont également montré que la copie de génome additionnelle pouvait être différente entre 2 souches triploïdes (Fig. 10). Ceci suggère donc que des évènements d'hybridation interspécifique indépendants se seraient produits. Cette polyploïdie joue un rôle majeur dans les processus d'évolution des levures et pourrait présenter un avantage adaptatif vis-à-vis des stress environnementaux (Albertin and Marullo., 2012) ; ainsi plus de 50% des souches de *Brettanomyces bruxellensis* présentent un génome triploïde (Avranova et al., 2018 ; Harrouard et al. 2022).

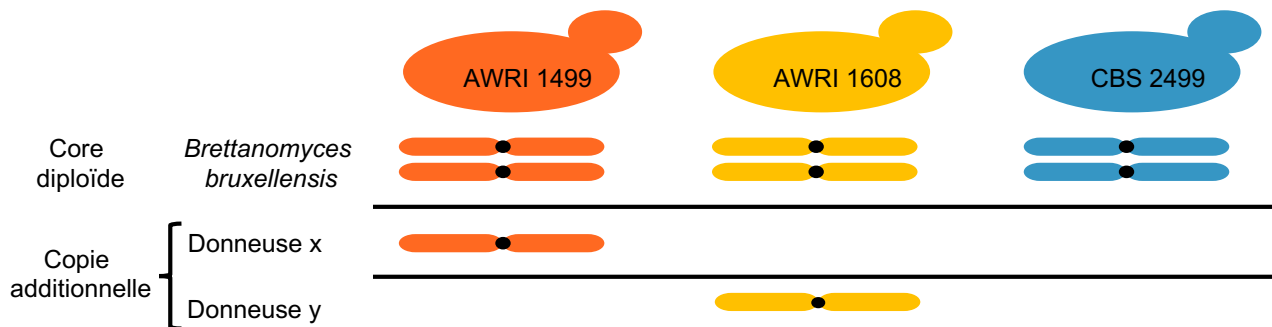


Figure 10 : Représentation schématique de la polyplôidie chez *Brettanomyces bruxellensis*. D'après Borneman et al., 2014

La variation du nombre de copie d'un gène (CNV) associé au niveau de plôidie peuvent jouer un rôle important dans l'adaptation des individus à l'environnement dans lequel ils se trouvent. En effet, des copies multiples de gènes pourraient avoir un impact positif pour la colonisation d'un nouveau milieu (Harrouard et al., 2022). Il a également été montré chez les individus allotriploïdes que le core génome est plus propice à ces évènements de duplication que la copie additionnelle (Gounot et al., 2020).

Une avancée majeure dans la compréhension de la structure des populations de *B. bruxellensis* a été réalisée à la suite du séquençage de la souche triploïde AWRI 1499. Cette avancée rapide et discriminante repose sur l'identification de 12 marqueurs microsatellites spécifiques à l'espèce (Albertin et al. 2014). Ces marqueurs microsatellites sont des séquences d'ADN d'une longueur de 1 à 6 nucléotides répétés en tandem de 10 à 30 fois. Ces marqueurs étant dominants, ils rendent possible l'étude des populations complexes mettant en évidence des états aneuploïdies et polyploïdie. Les différentes souches peuvent donc être discriminées en fonction de leur génotype. Ainsi la diversité génétique de l'espèce peut être décrite via l'observation de

ces locus microsatellites polymorphes. L'analyse microsatellite de 1488 isolats de *B. bruxellensis* issus de différentes origines géographiques et niches écologiques a été le point de départ des études sur la structure des populations de l'espèce (Avramova et al., 2018). Il a ainsi été montré que la structure de la population était principalement expliquée par la ploïdie à 47% suivie de la niche d'origine à 6% et enfin de l'origine géographique à 5%. Par ailleurs, si l'on considère uniquement les isolats provenant du vin la variable origine géographique explique désormais 55% de la structure de la population indiquant ainsi que les souches présentes dans le vin sont largement réparties sur Terre en lien avec les différents vignobles (Avramova et al., 2018 ; Harrouard et al., 2022). Les isolats provenant de milieux fermentaires (Bière, Kombucha, tequila bioethanol) autres que le vin sont répartis majoritairement sous 2 groupes suggérant des processus d'adaptation similaires entre ces différentes niches anthropiques (Avramova et al., 2018). Ainsi il est possible de structurer la population selon 2 facteurs, le niveau de ploïdie et le substrat d'origine. Cette structuration a donc donné 6 groupes génétiques distincts (Fig. 11) (Avramova et al., 2018 ; Harrouard et al., 2022) : 2 groupes diploïdes, l'un formé d'isolat provenant principalement de vin (Wine 3/CBS 2499 like) et un autre composé d'individus provenant de kombucha, bière et vin (Kombucha/L14165 like), 4 groupes triploïdes, 1 groupe composé d'isolat issu du vin (Wine 1/AWRI 1499 like), 1 groupe issu d'isolat de bière et de vin (Beer/AWRI 1608 Like), 1 groupe formé d'isolats de la filière bioéthanol et tequila (Teq/EtOH/CBS 5212 like) et enfin un autre groupe issu d'isolats de vin (Wine 2/L0308 like).

De récents travaux sur le séquençage des génomes d'isolats de *B. bruxellensis* ont permis de valider et d'affiner ses différents groupes génétiques (Gounot et al., 2020 ; Eberlein et al., 2021). Le séquençage du génome a également révélé l'existence d'une souche autotétraploïde génétiquement proche d'une petite sous-population déjà observée mais décrite comme étant diploïde (Harrouard et al., 2022).

Un lien entre groupe génétique et certains traits phénotypiques a été confirmé. Pour plusieurs études, la concentration en SO₂ moléculaire nécessaire pour stopper la croissance est variable selon la souche testée allant de 0,2 à 1 mg/L⁻¹. Il a ainsi été montré que les souches présentes dans le groupe Wine 1 et Wine 2 présentaient une tolérance plus élevée que les autres groupes au SO₂ (Avramova et al., 2018b). Le fait que des phénotypes de tolérance aux SO₂ soient présents dans deux groupes génétiquement distincts (un autotriploïde, un allotriploïde) peut

indiquer une acquisition indépendante de mécanismes adaptatifs en lien avec le niveau de ploïdie.

5. *Brettanomyces bruxellensis* dans l'industrie brassicole

Brettanomyces bruxellensis est historiquement liée au monde brassicole du fait qu'elle fût

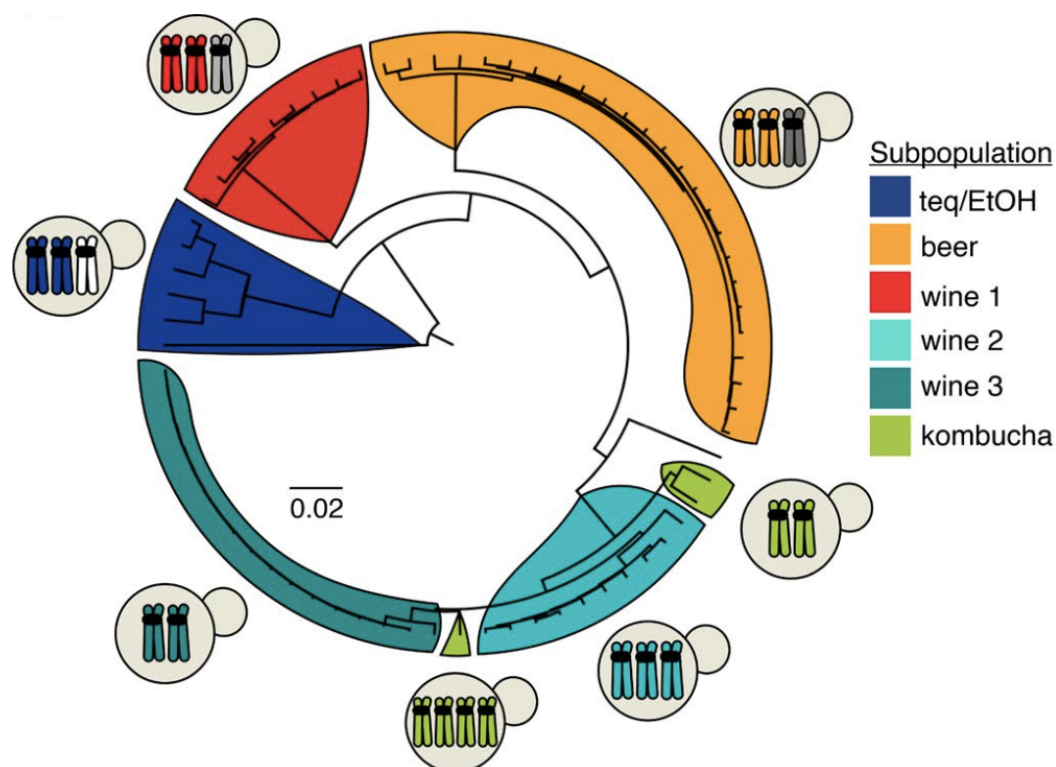


Figure 11 : Structure de la population de *Brettanomyces bruxellensis* (Harrouard et al., 2022) Le niveau de ploïdie de chaque population a été schématisé, deux chromosomes représentent la diploïdie, trois chromosomes représentent la triploïdie. Les chromosomes gris clair, gris foncé et blancs représentent quant à eux les génomes haploïdes indépendants acquis par des espèces inconnues

isolée pour la première fois dans une English Stock Ale par Claussen en 1904 à la suite d'une seconde fermentation apportant un profil aromatique spécifique (Claussen., 1904). Son utilisation dans le domaine brassicole est par ailleurs contestée selon de type de bière brassée. En effet, sa présence est essentielle pour certaines bières de spécialités dont la fermentation a lieu spontanément alors que dans le cas de bières où la fermentation est contrôlée, la présence de *B. bruxellensis* est redoutée.

Elle est associée à de nombreuses bières de spécialité comme les lambics et gueuzes belges, les bières allemandes Berliner Weisse ainsi qu'aux bières américaines American Coolship Ale (Fig. 12) (Bokulich et al., 2012 ; Suiker and Wösten., 2022). Ces bières de spécialités sont issues principalement de fermentation spontanée des moûts après cuisson (Crauwels et al., 2015). La fermentation de ces bières spécifiques est conduite sur plusieurs mois afin d'obtenir

leur typicité aromatique. Conjointement à la fermentation conduite par des levures *Saccharomyces spp.* des microorganismes de l'environnement (*Enterobacteriaceae*, *Pichia spp.*, *Rodothorula spp.*,...) vont venir coloniser le moût en fermentation et participer à la diminution de pH. A la suite de cette fermentation, une phase d'acidification par des bactéries lactiques (*Pediococcus spp.*) a lieu. Cette phase d'acidification est suivie de la maturation en tonneau où la majorité des sucres simples sont dégradés et la concentration en éthanol atteint 5-6%. A partir de ce moment, la concentration en *B. bruxellensis* augmente du fait de ses capacités à dégrader les sucres complexes restants (maltotétraose et maltopentose) (Crauwels et al., 2015). Cette conversion des sucres complexes est rendue possible par une activité α -glucosidase (Kumara et al., 1993 ; Serra Colomer et al., 2019). Il se produit également une production de composés volatils comme des phénols volatils, des esters et des acides qui vont participer à la typicité aromatique de la bière. Les esters produits participent aux notes fruitées de la bière comme l'ananas, la mangue, la poire ou le raisin (Serra Colomer et al., 2019). Des notes florales peuvent également être présentes du fait de l'activité β -glucosidase de certaines souches qui permet l'hydrolyse des glycoconjugués végétaux du houblon et des fruits présents dans le cas de bières aromatisées (Crauwels et al., 2015).

Avec l'essor des microbrasseries depuis les années 1990, les consommateurs redécouvrent ces bières de spécialité aux arômes particuliers faisant intervenir des levures autres que *Saccharomyces spp.* dans leurs processus de fermentation (Baiano et al., 2020). Ces bières ont



Figure 12: Les différents styles de bière où *Brettanomyces bruxellensis* est associée au process de fabrication et leur typicité aromatique (Serra Colomer et al., 2019)

la particularité de présenter une acidité importante (India Pale Ale, IPA) et peuvent être issues d'une fermentation conduite par *B. bruxellensis* du fait de ses capacités à produire des acides comme l'acide acétique.

Dans le cas de certaines bières dont la fermentation est conduite exclusivement par *S. cerevisiae* ou *S. pastorianus*, la présence de *B. bruxellensis* est redoutée la catégorisant ainsi comme une levure d'altération (Steenels, et al., 2015 ; Holt et al., 2018 ; Suiker and Wösten., 2022). Sa présence peut ainsi entraîner des ralentissements voir même des arrêts de fermentation et des modifications du profil aromatique de la bière (Holt et al., 2018). Sa capacité à fermenter les sucres fermentescibles et sa résistance à l'éthanol en font donc un microorganisme d'altération majeur dont la persistance dans les environnements fermentaires contribue à un risque de contamination.

6. *B. bruxellensis* et la filière bio-éthanol

L'utilisation des énergies fossiles est remise en question du fait des dégâts écologiques qu'engendrent leurs extractions et leurs utilisations sur l'environnement, notamment depuis le début des années 2000. Des techniques de production d'énergie dite « verte » se développent avec un impact environnementale moindre que celui des énergies fossiles. La production de bioéthanol, qui consiste à obtenir des biocarburants à partir de matières végétales est l'une des filières les plus prometteuses dans la production d'énergie « verte ». Cette matière végétale peut être issue de la canne à sucre ou du maïs et participe à la production de biocarburants de première génération. Pour des raisons éthiques, la production de bioéthanol est de plus en plus réalisée à partir de déchets lignocellulosiques peu chers et disponibles en grandes quantités (Kang et al., 2014 ; Lynd., 2017). Il en résultera la production de biocarburant de seconde génération (Wang et al., 2014). Ce processus fait intervenir des microorganismes d'intérêt. La première action principalement fongique, consiste en une hydrolyse des sucres complexes comme la cellulose, l'hémicellulose (Fig. 13). Ces sucres complexes une fois hydrolysés se retrouvent sous forme de D-glucose, D-mannose, D-xylose, L-arabinose et D-cellobiose pouvant être fermentés par des levures pour la production d'éthanol (Bušić et al., 2018). Les levures fermentant ces sucres sont dans la majorité des cas des *S. cerevisiae* commerciales sélectionnées pour leurs aptitudes à la conversion des sucres en éthanol. Par ailleurs, le D-cellobiose, le D-xylose et le L-arabinose n'étant pas dégradables par *S. cerevisiae*, l'utilisation de souches génétiquement modifiées est nécessaire pour une dégradation totale de ces sucres (Wang et al., 2017).

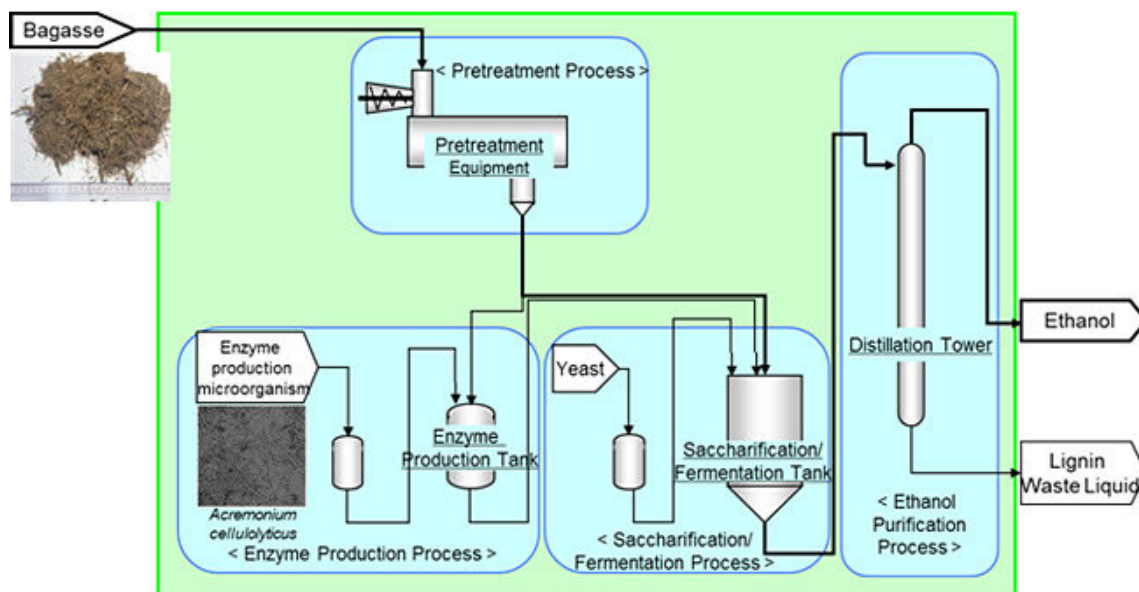


Figure 13 : Process de production de bioéthanol à partir de déchets lignocellulosiques (Mamudu., 2019)

Des contaminations microbiennes peuvent avoir lieu lors de la phase de fermentation et sont considérées comme très problématiques induisant des pertes de rendement dans la conversion des sucres en éthanol (Seo et al., 2020). *B. bruxellensis* s'avère être le principal agent de contamination (Beckner et al., 2011). Une fois présente, elle est capable de dégrader de nombreux sucres diminuant ainsi la part disponible de *S. cerevisiae* (Leite et al., 2013).

Par ailleurs dans certains cas, il a été montré que la grande capacité à dégrader les sucres complexes comme la cellobiose pouvait être un avantage biotechnologique pour la production de bioéthanol (de Barros Pita et al., 2019). Cette dégradation du cellobiose est rendue possible par l'activité β -glucosidase *B. bruxellensis* et le rendement en éthanol en découlant est relativement similaire à *S. cerevisiae* (Blomqvist et al., 2011 ; Curtin et al., 2012). La présence d'oxygène semble aussi être impactante sur l'utilisation de ce sucre par *B. bruxellensis* (de Barros Pita et al., 2019). En condition aérobie, elle est capable de l'assimiler et croître de façon similaire à la croissance en présence de glucose (Leite et al., 2013). En ce qui concerne l'absence d'oxygène, l'assimilation est également possible mais avec une efficacité réduite (Reis et al., 2014).

La capacité à l'assimilation des nitrates peut également expliquer la présence de *B. bruxellensis* dans la filière des bioéthanol. En effet, les végétaux utilisés lors de cette transformation sont souvent traités aux nitrates durant leur culture comme engrais inorganiques (Colla et al., 2018) Ainsi, durant la fermentation, lorsque l'azote disponible vient à diminuer, *B. bruxellensis* va

pouvoir assimiler les nitrates contrairement à *S. cerevisiae* qui en est incapable et continuer à fermenter les sucres présents.

7. *B. bruxellensis* et la production de kombucha

Au cours de la dernière décennie, la consommation de kombucha s'est démocratisée du fait de ces propriétés antioxydantes (Antolak et al., 2021). Cette boisson originaire d'Asie de l'Est résulte de la fermentation de thé sucré réalisée par un consortium de microorganismes lui apportant sa typicité sensorielle. Ces microorganismes sont présents sous la forme d'un biofilm cellulosique (SCOBY) présent à l'interface air-liquide (Jayabalon et al., 2014) Ce biofilm air-liquide donne ainsi à la fois aux microorganismes qui le composent un accès à l'oxygène et aux nutriments présents dans le thé (Teoh et al., 2004 ; Malbaša et al., 2011 ; Harrison and Curtin., 2021). La composition du SCOBY est variable d'un kombucha à l'autre. Cependant la production de cellulose est réalisée par des bactéries acétiques du genre *Gluconacetobacter*. Ces bactéries acétiques sont aussi responsables de la production d'acides organiques faisant partie intégrante du profil aromatique aigre-doux du kombucha (Balentine et al., 1997 ; Teoh et al., 2004). D'autres bactéries acétiques comme des *Acetobacter spp.* et *Gluconobacter spp.* ont également été isolées de certains Kombuchas (Chen and Liu., 2000 ; Coton et al., 2017 ; Mas et al., 2022). Des bactéries lactiques appartenant majoritairement aux genre *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Oenococcus* sont aussi présentes lors de la fermentation mais leurs rôles ne sont pas encore clairement définis (Fig. 14).

Les levures jouent également un rôle central dans la fermentation du kombucha en convertissant le saccharose en éthanol qui pourra lui-même être dégradé en acides organiques par les bactéries acétiques (Harrison and Curtin., 2021). Elles appartiennent principalement au genre *Brettanomyces* dont *B. bruxellensis* est l'espèce majoritaire (Coton et al., 2017 ; Villarreal-Sotoe et al., 2018) D'autres levures comme *Zygosaccharomyces spp*, *Candida spp*, *Pichia spp*, *Saccharomyces spp* et *Torulasporea spp* peuvent aussi être présentes (Fig. 14) (Teoh et al., 2004 ; Marsh et al., 2014). Le rôle de *B. bruxellensis* dans cette fermentation reste flou mais son activité invertase permettrait l'hydrolyse du saccharose en unité de glucose et de fructose. Elle participerait également à la typicité aromatique (Tran et al., 2020). Ces levures présentes à la fois dans la phase liquide et la phase solide se retrouvent sous différentes morphologies (Reva et al., 2015 ; Chakravorty et al., 2016) En effet, les levures composant le SCOBY sont le plus souvent sous forme de pseudohyphes (principalement *B. bruxellensis*) permettant de créer un maillage emprisonnant les bactéries pouvant ainsi produire de la matière cellulosique (Tran et al., 2021).

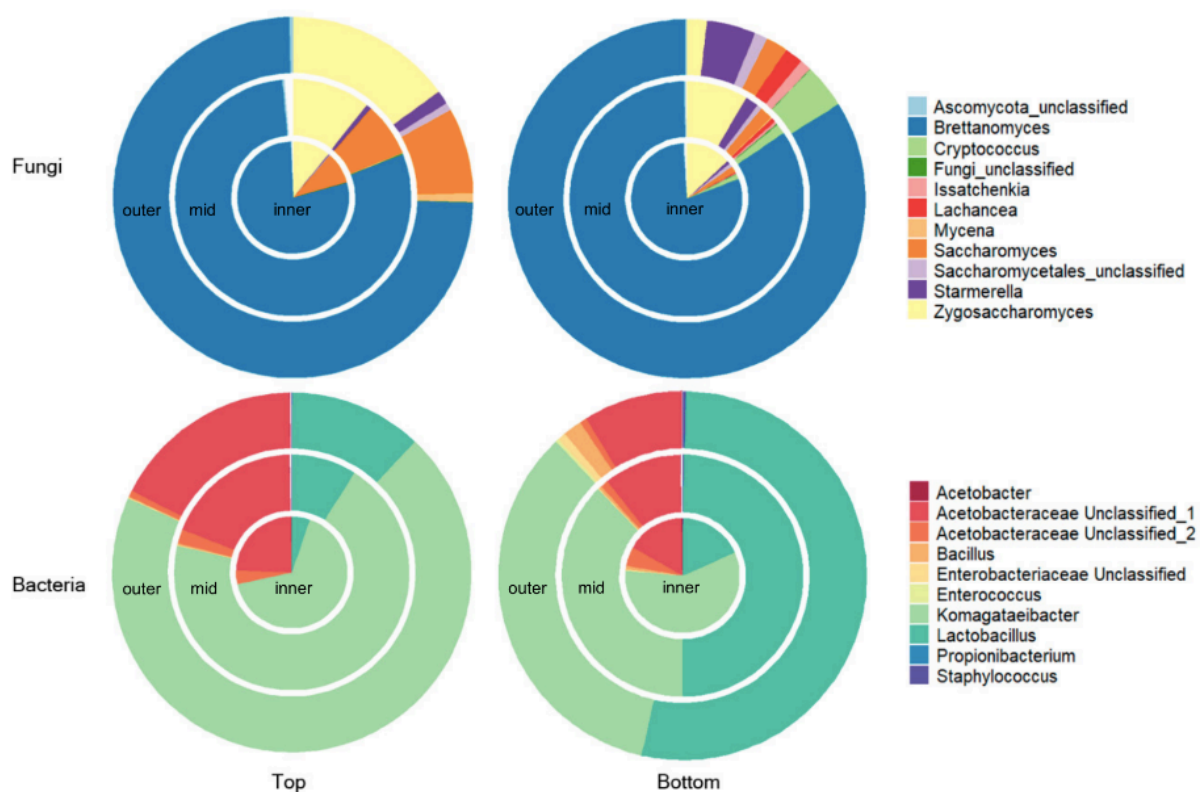


Figure 14 : Composition des communautés fongiques et bactériennes au sein de SCOBY de kombucha sectionnés obtenue par metabarcoding (Harrison and Curtin., 2021).

8. *Brettanomyces bruxellensis* en œnologie : un ennemi à combattre

La première observation de *B. bruxellensis* dans le domaine viti-vinicole remonte à 1933 dans un moût de raisin en fermentation. Cependant, sa présence en œnologie est sûrement bien antérieure du fait d'identifications dans des vins datant du début du XXe siècle (Renouf et al., 2007 ; Albertin et al., 2014 ; Cibrario et al., 2018). Elle est géographiquement présente dans la quasi-totalité des pays producteurs de vin et principalement associée à l'élaboration des vins rouges (Dias et al., 2003). Il est également possible de la retrouver sur vin blanc de façon beaucoup plus rare. Une hypothèse permettant d'expliquer cette spécificité serait des teneurs en SO₂ moléculaire plus élevée et un pH plus bas dans les vins blancs limitant ainsi leur viabilité (Loureiro and Malfeito-Ferreira., 2003).

8.1. Contamination des vins

Les sources de contamination des vins sont nombreuses et peuvent survenir à toutes les étapes de la vinification (Martorell et al., 2006). Au vignoble, jusqu'à présent, *B. bruxellensis* n'a pas été identifiée sur le matériel végétal (feuille, racine, écorce) ou dans le sol (Davenport., 1976). Néanmoins, des observations de *B. bruxellensis* ont pu être réalisées à la surface de la baie de raisin mais en faibles quantités (Barbin et al., 2008 ; Renouf et al., 2007). Des facteurs de l'environnement, tels que l'humidité ou l'état sanitaire des baies pourraient expliquer la fréquence plus élevée de *Brettanomyces bruxellensis* au vignoble (Barbin et al., 2008). Le fait qu'elle soit faiblement présente dans l'environnement peut limiter son identification dans des écosystèmes étant dominés par de multiples espèces et nécessite la mise en œuvre de protocole d'enrichissement préalablement à la mise en culture.

Sa présence au chai a également été avérée par des prélèvements de bioaérosols mais aussi de surfaces, sur les murs et sols ainsi que sur le matériel vinaire comme les cuves et les pompes (Fugelsang., 1998 ; Connell et al., 2002). Ces équipements ayant été en contact avec *B. bruxellensis* et mal nettoyés sont considérés comme le principal vecteur de contamination. Au chai, les drosophiles et plus particulièrement *Drosophila melanogaster* sont-elles aussi liées à la dissémination de *B. bruxellensis* (Martorell et al., 2006).

Au cours de la vinification, les étapes pré-fermentaires sont peu propices à des contaminations par *B. bruxellensis* du fait d'une forte dominance de levure non-*Saccharomyces* mais également du fait d'une croissance lente et une faible tolérance aux milieux riches en sucre comme le moût de raisin (Barata et al., 2008). Lorsqu'elle est présente en faible quantité dans le moût de raisin de façon précoce, une croissance peut avoir lieu, avec des niveaux de populations atteints qui peuvent concurrencer *S. cerevisiae* lors de fermentations languissantes. Une fois la fermentation terminée, le milieu est pauvre en nutriments et riche en alcool induisant une diminution de la viabilité chez *S. cerevisiae*. A ce stade, *B. bruxellensis* est la principale levure non-*Saccharomyces* à subsister dans le vin, à pouvoir tolérer l'éthanol et assimiler les sucres résiduels (Renouf., 2006 ; Cibrario et al., 2020). Au cours de la FML, la concentration en SO₂ moléculaire étant encore faible ainsi que l'augmentation du pH sont des facteurs favorisant son développement. *B. bruxellensis* présente également la capacité à se multiplier en présence de températures faibles dès 12°C la rendant problématique au cours de l'élevage à des températures de l'ordre de 12 à 15°C (Cibrario et al., 2019). De plus, l'autolyse de *S. cerevisiae* permet la libération de tréhalose étant dégradable en grande quantité par *B. bruxellensis* comme source carbonée (Renouf et al., 2006 ; Cibrario et al., 2020). L'élevage en barrique bois est une étape où la présence de *B. bruxellensis* est avérée malgré des traitements réguliers au SO₂. Elle

se retrouve principalement dans les lies qui jouent un rôle protecteur vis-à-vis du SO₂ ainsi que dans les micropores du bois où il est possible de la retrouver jusqu'à 8 mm de profondeur lui permettant d'avoir accès aux sucres comme le cellobiose (Oelofse et al., 2008 ; Cibrario et al., 2020).

8.2. Impact de *B. bruxellensis* sur les qualités organoleptiques des vins

B. bruxellensis est considérée comme étant la levure d'altération la plus préjudiciable une fois présente au sein d'une cave. Elle est rapportée comme étant présente dans 50% des vins en élevage pour les vignobles du Rhône, de Bourgogne et du Val de Loire (ITV-France., 2006). En Bourgogne, plus d'un tiers des vins provenant des millésimes 2010 à 2012 présentaient des défauts liés à *B. bruxellensis* à des concentrations supérieures au seuil de détection olfactif (BIVB., 2017). Cependant, les chiffres sur l'impact de *B. bruxellensis* sur la filière viti-vinicole sont sans doute sous-estimés du fait que de nombreux professionnels ne souhaitent pas communiquer sur la présence de *B. bruxellensis* au sein de leurs propriétés. En effet, la présence de *B. bruxellensis* a longtemps été considérée comme étant liée à un manque d'hygiène au chai. Par ailleurs, une étude menée sur 3 domaines californiens a montré que dans le cas d'une lutte modérée contre *B. bruxellensis*, les pertes économiques étaient estimées à environ 1,4 million de dollars pour 2000hl de vins déclassés (Alston et al., 2021)

B. bruxellensis par sa capacité à produire de l'acide acétique participe à l'acidité volatile des vins ce qui peut être problématique car la réglementation européenne a fixé la limite à 1,2 g/L d'acide acétique dans les vins rouges (Vigentini et al., 2008). Cette production est accentuée en présence d'oxygène ainsi l'inertage des cuves avec des gaz neutres comme l'azote est conseillé pour limiter la croissance des microorganismes (Aguilar-Uscanga et al., 2003 ; Joseph et al., 2013 ; Rozpedwoska et al., 2011). Elle est également à l'origine de la production de molécules responsables d'un défaut appelé « goût de souris » (Grbin and Henschke., 2000) qui se caractérise en bouche par un arôme de peau de saucisson, popcorn et riz. D'autres microorganismes comme les bactéries lactiques seraient également capables de produire ce défaut (Heresztyn., 1986).

Enfin, *Brettanomyces bruxellensis* est associée à la production de phénols volatils responsables de dépréciations organoleptiques majeurs entraînant un rejet du consommateur et donc par la même occasion des pertes économiques (Chatonnet et al., 1992 ; Alston et al., 2021). Les phénols volatils sont une famille de molécules aromatiques répartis en 2 groupes de molécules, l'éthyl-4-phénol (4EP), l'éthyl-4-guaiacol (4EG) et l'éthyl-4-catechol (4EC) formant le groupe des ethyls phénols et le vinyl-4-phénol (4VP), le vinyl-4-guaiacol (4VG) et le vinyl-4-catéchol (4VC) pour les vinyls phénols (Chatonnet et al., 1992 ; Loureiro and Malfeito-Ferreira., 2003). Les éthyls phénols sont en proportion majoritaire dans les vins rouges contrairement aux vinyls phénols qui sont présents en concentration plus faible. Les moûts en fermentation sont peu sujet à une production de phénols volatils alors que dans les vins en post-fermentation, la concentration peut être élevée (en mg/L) (Licker et al., 1998). Ces molécules vont avoir pour effet de masquer l'arôme fruité ainsi que la perception hédonique du vin (Lattey et al., 2010 ; Tempère et al., 2016). Plusieurs descripteurs peuvent être associés aux phénols volatils (Chatonnet et al., 1992). Le 4EP est décrit comme évoquant des odeurs de cuir, d'écurie, de sueur de cheval alors que le 4EG lui s'apparente plus à des arômes épicés, clou de girofle. Le 4VP quant à lui est assimilé aux odeurs pharmaceutiques. Le seuil de perception est différent selon les molécules mais également selon les dégustateurs (Tempère et al., 2014). Le seuil moyen de perception serait d'environ 420 µg/L (Chatonnet et al., 1992). Les précurseurs des phénols volatils sont les acides hydroxycinnamiques sous formes estérifiées avec l'acide tartrique (acide p-coutarique, fertarique et caftarique) issus de la vacuole des cellules de la

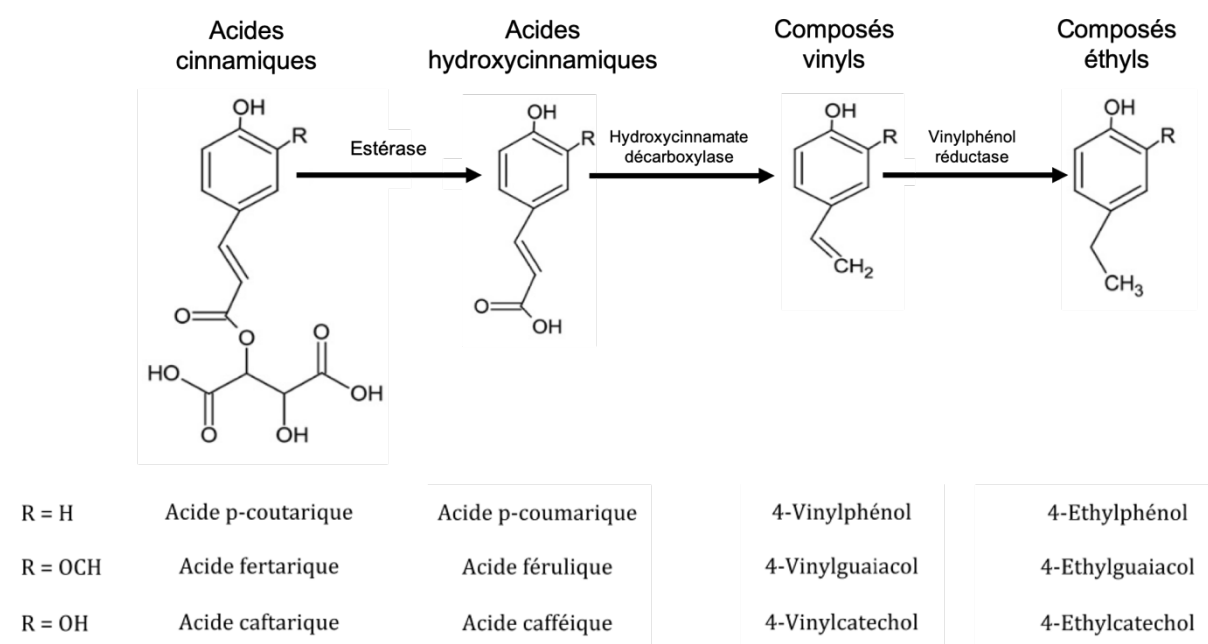


Figure 15 : Biosynthèse des phénols volatils. D'après Steenels et al., 2015

pellicule et de la pulpe du raisin (Schopp et al., 2013). Leurs concentrations sont dépendantes du matériel végétal, du cépage ainsi que du millésime. Ces précurseurs sous forme estérifiée, ne sont pas métabolisables par *B. bruxellensis*. Une désesterification par l'action d'enzymes exogènes ou par hydrolyse acide va donner des acides para-coumarique, ferulique et caféique (Ginjom et al., 2011). A cette étape, les précurseurs peuvent être assimilés et décarboxylés par une hydroxycinnamate décarboxylase en composés vinyloxy pouvant à leur tour être réduits par une vinylphénol réductase en composés éthyles (Fig. 15) (Chatonnet et al., 1992, Steenels et al., 2015).

Toutes les souches de *B. bruxellensis* étudiées ont montré des capacités à produire des phénols volatils. Cependant la proportion reste variable selon les souches (Agnolucci et al., 2009 ; Renouf et al., 2009 ; Cibrario et al., 2020). Il semblerait également que le milieu et plus particulièrement le pH impactent la production de ces phénols volatils (Benito et al., 2009).

8.3. Prévention, détection et élimination de *B. bruxellensis*

La prévention contre des contaminations par *B. bruxellensis* passe sans aucun doute par une bonne hygiène au chai et à la cave. En effet, il a été montré que le matériel vinaire mal nettoyé pouvait être un vecteur de contamination des vins (Fugelsang., 1998 ; Connell et al., 2002). Cette bonne hygiène doit être initiée dès la réception de la vendange où un tri va être effectué pour écarter les baies éclatées ou altérées par de la pourriture (Stadler and Fischer, 2020). En effet, il a été montré que la pourriture acide et la présence de *Botrytis cinerea* pouvaient favoriser la présence de *B. bruxellensis* dans les moûts (Loureiro and Malfeito-Ferreira., 2003 ; Barbin et al., 2008). L'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) a publié un guide des bonnes pratiques d'hygiène afin d'accompagner les vignerons dans leurs procédures de nettoyage (OIV., 2022). L'utilisation de solutions alcalines de nettoyage détergentes et acides semble présenter une efficacité intéressante vis-à-vis de *B. bruxellensis* (Deluchat et al., 2021). Cependant, une hygiène excessive n'est pas non plus souhaitée car celle-ci pourrait engendrer l'élimination de tous les microorganismes présents dont ceux se trouvant sous forme de biofilms positifs limitant l'installation des microorganismes d'altération positifs (Alvarez-Ordóñez et al., 2019).

La méthode la plus couramment utilisée pour limiter la croissance de microorganismes dans le vin est le sulfitage (ajout de dioxyde de soufre (SO₂)) (Romano and Suzzi., 1993). Le SO₂ présent dans le vin se retrouve sous 2 formes, le SO₂ combiné pouvant être lié à des sucres, aldéhydes, cétones et le SO₂ libre (moléculaire) présentant les propriétés antimicrobiennes. La teneur minimale permettant une inhibition de *B. bruxellensis* est complexe à déterminer car

plusieurs facteurs peuvent influencer l'action du SO₂. En effet, le pH, la température, la concentration en éthanol et la présence d'oxygène peuvent moduler la proportion du SO₂ moléculaire et son action (du Toit et al., 2005). Des pH bas et une température élevée sont favorables à l'action du SO₂ (Egli et al., 1998). Dans un contexte de changement climatique, l'augmentation des pH des vins est donc un réel problème pour la conduite d'un sulfitage raisonné. L'élevage est une étape de la vinification où l'ajout de SO₂ doit être réalisé régulièrement car le soutirage induit une oxygénation du vin limitant l'action du SO₂ et l'utilisation de barriques neuves engendre une absorption du SO₂ par le bois (Chatonnet et al., 1993). La dose de 0,4-0,6 mg/L de SO₂ moléculaire est recommandée pour inhiber la croissance de *B. bruxellensis*. Cependant il a été montré que des souches pouvaient être résistantes/tolérantes au SO₂ nécessitant l'augmentation de ces doses usuelles d'emploi (Curtin., 2012a ; Avramova et al., 2018b).

Afin de pouvoir contrôler les niveaux de population de *Brettanomyces bruxellensis* dans les vins, différentes techniques d'analyses impliquant ou non la mise en culture ont été développées. L'analyse la plus couramment utilisée est la culture sur milieux gélosés sélectifs du fait des coûts peu onéreux de cette analyse. Elle est principalement réalisée sur des milieux nutritifs supplémentés en actidione (50 mg/L), qui inhibe la croissance de très nombreuses levures présentes dans le domaine œnologique (Morneau et al., 2011). Cette technique permet la quantification de *B. bruxellensis* avec un seuil de détection bas à 1 UFC/mL de vin. Cependant, cette technique ne permet pas la quantification des cellules dont le métabolisme est actif mais la croissance sur milieu solide est inhibée (VNC, Viable non cultivable) et nécessite plusieurs jours d'incubation avant de pouvoir lire le résultat (Divol and Lonvaud-Funel., 2005). L'identification par MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry) à partir de colonies isolées donne également de bons résultats mais nécessite une base de données robuste afin d'obtenir une identification précise et une étape préalable d'isolement sur milieu gélosé est nécessaire (Turvey et al., 2016).

Des outils d'identification génétique pour identifier les colonies isolées peuvent également être utilisés comme la PCR RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), la PCR RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Dias et al. 2003 ; Martorell et al., 2006). L'utilisation de l'outil breveté TypBrett (WO2017068284, 10/2016) reposant sur l'analyse de 12 marqueurs microsatellites permet une identification de *B. bruxellensis* et plus particulièrement des souches triploïdes du vin et de la bière et ainsi prédire le comportement vis-à-vis des sulfites (Wine 1 et Beer) (Albertin et al., 2014).

Les méthodes d'identification directe de *B. bruxellensis* reposent principalement sur la PCR quantitative permettant une meilleure spécificité (Delaherche et al., 2004 ; Agnolucci et al., 2007 ; Tessonnière et al., 2009) ; Elle permet ainsi d'obtenir un résultat en 24h et donc de s'affranchir du temps de croissance sur milieux de culture. La quantification des cellules VNC est ici rendue possible permettant une quantification plus juste de la population présente dans le vin. Cependant, les cellules mortes sont également comptabilisées induisant une surestimation de la population (Login et al., 2016). L'utilisation d'intercalants d'ADN comme l'ethidium monoazide permet de quantifier uniquement les cellules vivantes (Andorrà et al., 2010).

L'utilisation de la cytométrie en flux spécifique par marquage génétique présente également un grand intérêt dans l'identification et la quantification de *Brettanomyces bruxellensis* (Serpaggi et al., 2010 ; Login et al., 2016 ; de Bellis et al., 2022). Elle permet une identification rapide avec une limite de détection de l'ordre de 10^2 cell/mL.

D'autres techniques peuvent être utilisées mais se montrent moins fiables et plus prédictives que réalistes sur la population réelle de *B. bruxellensis* dans les vins. En effet de nombreux vigneron effectuent un suivi mensuel des phénols volatils (coût moindre) (Dominguez et al., 2002). Cependant, une augmentation de phénols volatils ne signifie pas forcément une augmentation de la population de *B. bruxellensis*. Inversement, des vins présentant de fortes populations en *Brettanomyces* peuvent présenter des concentrations en phénols volatils faibles. Une fois *B. bruxellensis* détectée dans les vins, plusieurs techniques d'élimination peuvent être mises en place. La première approche consiste à augmenter la dose de SO₂ dans les vins mais la présence de souches résistantes/tolérantes au SO₂ limite cette action. Du fait d'une politique de réduction des intrants dans l'alimentation, l'augmentation des doses de SO₂ dans les vins est mal perçue et incite les professionnels du domaine à s'orienter vers l'utilisation d'autres techniques de traitement. L'ajout de chitosan, un polysaccharide dérivé de la chitine montre des résultats prometteurs mais contrastés selon les souches présentes (Paulin et al., 2020 ; Velasquez., 2023). Le mode d'action du chitosan consiste en une adsorption à la surface des cellules entraînant la mort et la sédimentation de celles-ci. Les techniques de filtration avec des pores inférieurs à 0,45 µm et la filtration tangentielle montrent de bons résultats dans l'élimination de *B. bruxellensis* mais présentent l'inconvénient d'avoir un impact néfaste sur le profil aromatique des vin (Millet and Lonvaud-Funel., 2000 ; Serpaggi et al., 2012 ; Duarte et al., 2017). L'exposition des moûts et vins à des rayonnements Ultra-Violet (UV-C) ont montré une inhibition de *B. bruxellensis* (Pilard et al., 2021). Cependant, la pénétration du rayonnement dans des matrices troubles peut être limitée et donc impacter l'action des UV-C sur les

microorganismes (Diesler et al., 2019). Le traitement des vins par lumière pulsée contre *B. bruxellensis* a révélé une sensibilité importante de l'espèce à ce traitement avec cependant des variations intraspécifiques de réponse (Harrouard et al., 2023). Une alternative aux produits chimiques ou coûteux en énergie est l'utilisation de molécules antimicrobiennes produites par des levures. Ces molécules appelées toxines killer sont des composés protéiques produits par des levures afin de limiter la présence de levures concurrentes au sein d'un même environnement (Lowes et al., 2000). Ces killer toxines ont été identifiées pour la première fois chez *S. cerevisiae* et montrent des activités antimicrobiennes envers d'autres souches de *S. cerevisiae* dites sensibles et certaines espèces non-*Saccharomyces* (Soares and Sato., 2000). D'autres levures comme *Suhomyces pyralidae* (anciennement *Pichia pyralidae*) et *Kluyveromyces wickerhamii* sont également décrites comme productrices de toxines killer avec une activité antimicrobienne envers *B. bruxellensis* (Comitini et al., 2014 ; Meklomakulu et al., 2014 ; Agarbati et al., 2023). Chez *Suhomyces pyralidae*, les toxines killer CpKT1 et CpKT2 ont montré des activités intéressantes avec cependant des différences d'efficacité selon la souche testée. ; certaines souches ne présentent aucune sensibilité à la présence de ces molécules antimicrobiennes alors que d'autres présentent une sensibilité accrue (Meklomakulu et al., 2014). Ces toxines killer auraient une action ciblée sur la paroi et la membrane cytoplasmique de la cellule en inhibant la synthèse des glucanes membranaires. Ainsi l'utilisation de ces toxines killer semble être prometteur dans la lutte contre *B. bruxellensis* dans le cas où la souche présente est sensible à ces molécules antimicrobiennes. Cependant, les résultats présentés sont limités à l'échelle du laboratoire actuellement en milieu modèle et ne permettent pas d'envisager à court terme une utilisation à l'échelle industrielle en milieu vin.

8.4. Rémanence et persistance à la cave

Il a été observé empiriquement que les mois d'été étaient plus propices à un développement de *B. bruxellensis* et par la même occasion une augmentation des phénols volatils dans les vins (Chatonnet et al., 1992). Le reste de l'année les populations sont plutôt faibles en absence de contamination avérée. Ainsi, *B. bruxellensis* serait présente tout au long de l'année dans l'environnement du chai. Cette persistance peut s'expliquer par le fait qu'elle présente des capacités de survie dans des environnements pauvres en nutriment mais également par ses aptitudes métaboliques à adopter des états physiologiques de viabilité réduite de type VNC (Capozzi et al., 2016). Le fait de la retrouver dans l'air, sur les murs, sols, à la surface des cuves, dans les buses de récupération d'eau ainsi que sur le matériel vinaire montre sa grande dispersion au sein du chai et sa persistance dans cet environnement (Fugelsang., 1998 ; Connell

et al., 2002). Cette rémanence à la cave a également pu être confirmée par d'identification d'isolats génétiquement identiques sur plusieurs dizaines d'années au sein de différentes propriétés (Cibrario et al., 2019) En effet, des isolats identiques ont pu être identifiés à 86 ans d'intervalle dans la même propriété au sein des millésimes 1926 et 2012 (Fig. 16).

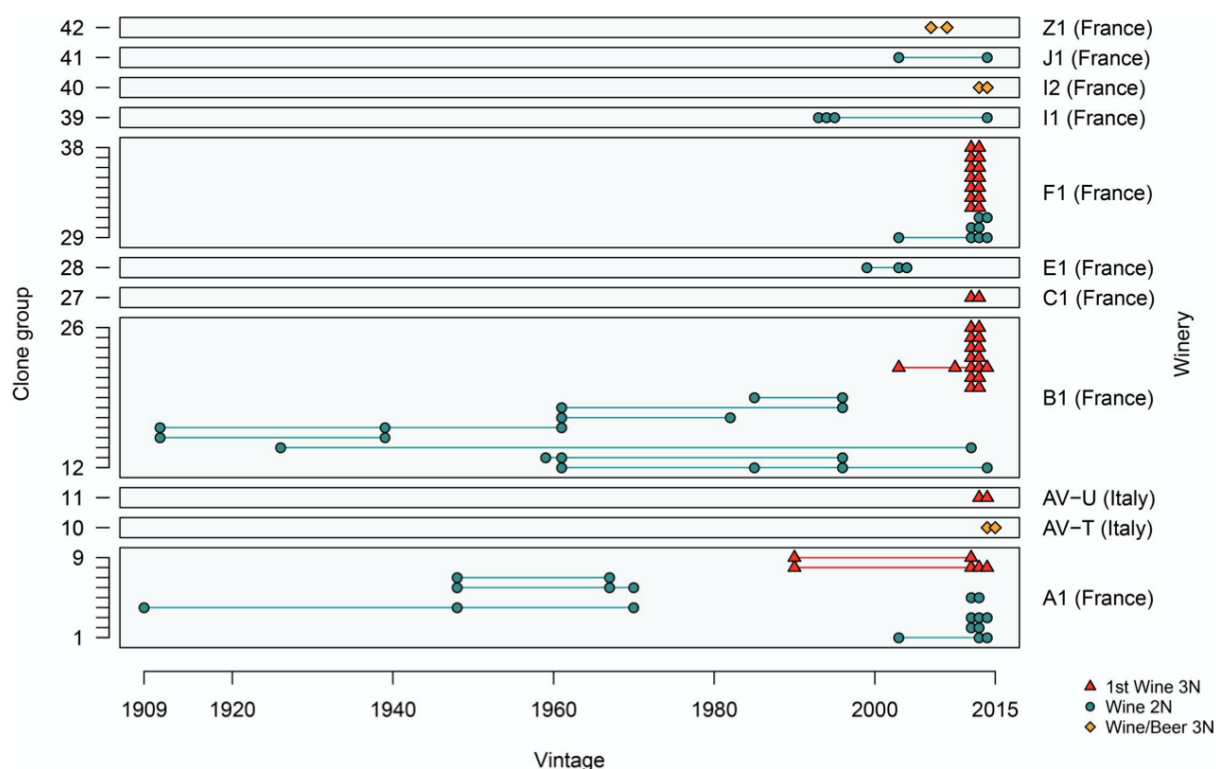


Figure 16 : Identification des groupes de clones identiques au sein d'une même propriété sur différents millésimes. Des isolats génétiquement identiques ont été regroupés en famille de clones (Cibrario et al., 2018).

Cette persistance a également été observée chez *S. cerevisiae* cependant sur des périodes plus courtes d'une vingtaine d'années (Börlin et al., 2016). Ces résultats montrent ainsi que des modes de vie ou des mécanismes spécifiques pourraient être à l'origine de phénomènes de persistance et de rémanence à la cave chez *B. bruxellensis*.

8.5. La formation de biofilm une réponse à la persistance de l'espèce au chai ?

L'un des phénomènes pouvant expliquer la persistance et la rémanence de *B. bruxellensis* au chai est sa capacité de bioadhésion. L'étude de cette capacité à la formation de biofilm chez cette espèce remonte aux années 2000 et plus précisément à 2007, avec la première publication scientifique sur le sujet (Joseph et al., 2007). Dès lors, plusieurs études ont été menées permettant d'améliorer les connaissances sur les propriétés de bioadhésion et formation de biofilm de l'espèce (Tristezza et al., 2010 ; Echeverrigaray et al., 2013 ; Poupault., 2015 ; Ishchuck et al., 2016 ; Kregiel et al., 2018 ; Dimopoulou et al., 2019, 2021 ; Lebleux et al.,

2020). Il a ainsi été montré que *B. bruxellensis* était capable de bioadhérer sur différents matériaux comme l'acier (Poupault., 2015, Lebleux et al., 2020), le verre (Kregiel et al., 2018) et enfin le polystyrène (Joseph et al., 2007 ; Tristezza et al., 2010 ; Echeverrigaray et al., 2013 ; Dimoloupou et al., 2019). Cette bioadhésion est observable pour la quasi-totalité des souches testées, cependant, la capacité à former des biofilms est souche dépendante (Joseph et al., 2007 ; Lebleux et al., 2020). Il semblerait également que les facteurs environnementaux comme le pH impacte la formation de biofilm (Joseph et al., 2007). L'observation de la bioadhésion dans une matrice vin a été peu étudiée rendant les résultats sur le sujet encore flous (Tristezza et al. 2010 ; Lebleux et al., 2020). De plus, le terme de biofilm utilisé dans la plupart des études est discutable ; en effet, aucune observation microscopique de bioadhésion ou de biofilm n'a été réalisée avant les travaux de Poupault en 2015 et ceux de Lebleux et al en 2020 sont réellement les premiers à documenter par des observations microscopiques la capacité de bioadhésion de *B. bruxellensis*. Dans certains travaux, la quantification de la bioadhésion est réalisée par des techniques de colorimétrie au cristal violet (Joseph et al., 2007 ; Dimopoulou et al., 2019) ou par mesure d'ATP (Kregiel et al., 2018). Les études réalisées par Lebleux et al en 2020 ont permis de mettre en évidence une variabilité morphologique au sein des cellules bioadhérées et cellules constituant le biofilm. En effet la présence de cellules pseudohyphales et des cellules ressemblant à des chlamydospores a pu être observée (Fig. 17). Par ailleurs, tous ces travaux ont été réalisés sur un nombre de souches restreint ne reflétant pas la diversité génétique et la structure des populations de l'espèce, qui constitue pourtant une composante majeure caractéristique de cette espèce.

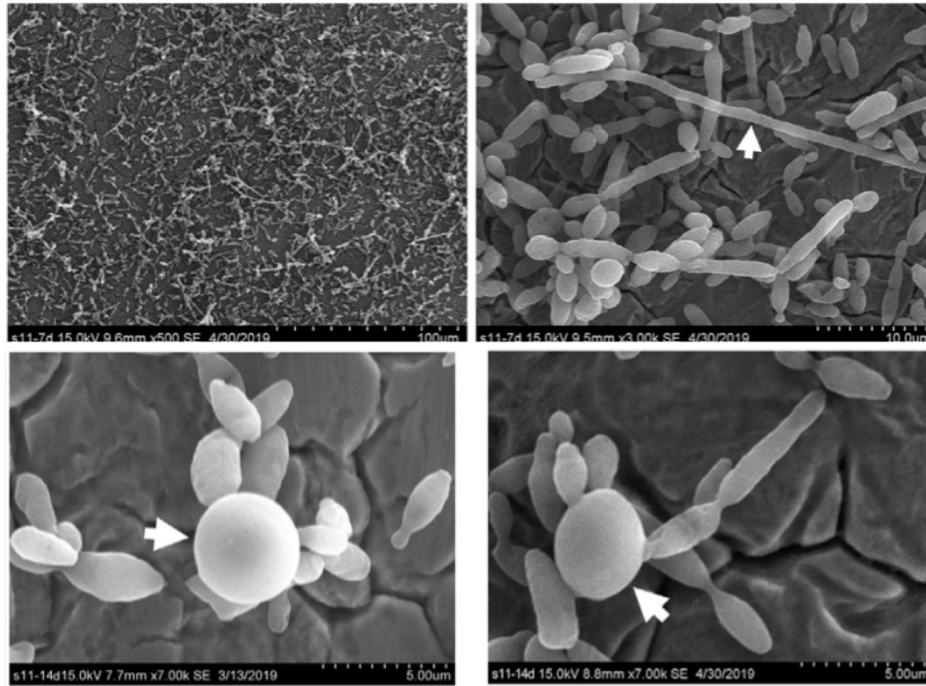


Figure 17 : Observations par microscopie électronique à balayage des cellules pseudohyphales et de chlamydospores au sein de cellules bioadhérées (Lebleux et al., 2020)

Chapitre 2 : High intraspecific variation of
the cell surface physico-chemical and
bioadhesion properties in *Brettanomyces*
bruxellensis

Cette partie correspond au premier objectif de la thèse qui est de caractériser les propriétés physico-chimiques de surface et de bioadhésion d'un nombre de souches représentatif de la diversité génétique de l'espèce. La mise au point d'un milieu modèle d'étude (Wine Like medium) mimant la composition du vin et permettant la croissance d'une majorité de souches de *Brettanomyces bruxellensis* avait été réalisée au préalable au laboratoire en prévision de ce travail. Réalisé en début de thèse, dans le contexte de la pandémie de la Covid-19, un retard important a été pris pour initier ces travaux, nécessitant une mise au point des protocoles à distance avec l'équipe du Professeur Marie-Noëlle Bellon-Fontaine. Cependant, la mise en oeuvre de méthodes robustes a permis de caractériser la charge de surface, l'hydrophobicité, la formation de cellules pseudohyphales et la bioadhésion de *B. bruxellensis* sur acier inoxydable sur un ensemble de 54 souches représentatives de la diversité génétique de l'espèce. Les résultats obtenus ont conduit à la rédaction d'un article scientifique accepté en janvier 2023 dans le journal Food Microbiology constituant ainsi le chapitre 2 de cette thèse.

Par la suite, la maîtrise des protocoles d'adaptation des cellules au milieu WLM, puis d'analyse des capacités de bioadhésion et de formation de cellules pseudohyphales a permis d'envisager un travail de phénotypage à plus grande échelle, réalisé dans le cadre d'un master recherche, qui est présenté en complément de l'article publié.

Partie 1. High intraspecific variation of the cell surface physico-chemical and bioadhesion properties in *Brettanomyces bruxellensis* (Article publié dans Food Microbiology)

Food Microbiology 112 (2023) 104217



Contents lists available at ScienceDirect

Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fm

High intraspecific variation of the cell surface physico-chemical and bioadhesion properties in *Brettanomyces bruxellensis*

Paul Le Montagner^{a,b,c,*}, Morgan Guilbaud^d, Cécile Miot-Sertier^a, Lysiane Brocard^e, Warren Albertin^{a,f}, Patricia Ballestra^a, Marguerite Dols-Lafargue^{a,f}, Vincent Renouf^b, Virginie Moine^c, Marie-Noëlle Bellon-Fontaine^d, Isabelle Masneuf-Pomarède^{a,g}

^a Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Sciences Agro, OENO, UMR 1366, ISVV, 33140, Villenave d'Ornon, France

^b Laboratoire EXCELL, Floirac, France

^c Biolaflort, Floirac, France

^d Univ. Paris-Saclay, SayFood, AgroParisTech, INRAE UMR 782, 91300, Massy, France

^e Univ. Bordeaux, Plant Imaging Platform, Bordeaux Imaging Center, UMS 3420, CNRS, 33000, Bordeaux, France

^f ENSCBP, Bordeaux INP, 33600, Pessac, France

^g Bordeaux Sciences Agro, 33175, Gradignan, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Brettanomyces bruxellensis
Spoilage
Pseudohyphae
Bioadhesion
Wine

ABSTRACT

Brettanomyces bruxellensis is the most damaging spoilage yeast in the wine industry because of its negative impact on the wine organoleptic qualities. The strain persistence in cellars over several years associated with recurrent wine contamination suggest specific properties to persist and survive in the environment through bioadhesion phenomena. In this work, the physico-chemical surface properties, morphology and ability to adhere to stainless steel were studied both on synthetic medium and on wine. More than 50 strains representative of the genetic diversity of the species were considered. Microscopy techniques made it possible to highlight a high morphological diversity of the cells with the presence of pseudohyphae forms for some genetic groups. Analysis of the physico-chemical properties of the cell surface reveals contrasting behaviors: most of the strains display a negative surface charge and hydrophilic behavior while the Beer 1 genetic group has a hydrophobic behavior. All strains showed bioadhesion abilities on stainless steel after only 3 h with differences in the concentration of bioadhered cells ranging from 2.2×10^2 cell/cm² to 7.6×10^6 cell/cm². Finally, our results show high variability of the bioadhesion properties, the first step in the biofilm formation, according to the genetic group with the most marked bioadhesion capacity for the beer group.

1. Introduction

The transformation of fruits into beverages involves fermentation processes. Traditionally, these fermentations are carried out by microorganisms naturally present in the environment and enable the development of the organoleptic properties and the preservation of the initial product (Liu et al., 2017). In wine, several microorganisms such as yeasts and bacteria are involved in the fermentation process. They contribute to the development of the aromatic panel by producing molecules of interest or wine defects (Gammacurta et al., 2017; Miljić et al., 2017; Tempère et al., 2018; Carpena et al., 2021). The presence of spoilage microorganisms is a real challenge for the sector, and their presence is carefully monitored (Lonvaud-Funel, 2016). *Brettanomyces*

bruxellensis is one of the most studied spoilage yeasts. Its presence is synonymous with the production of volatile phenols and more particularly 4-ethylphenol (4 EP) characterized by stable odors, horse sweat which cause consumer rejection (Chatonnet et al., 1992; Lattey et al., 2010; Agnolucci et al., 2017). The presence of *B. bruxellensis* is reported throughout the winemaking process, from grapes to the finished wine, due to mechanisms allowing it to grow under stressful conditions (Renouf and Lonvaud-Funel, 2007; Rubio et al., 2015; Avramova et al., 2018a). Genetic typing of 1488 isolates via the analysis of microsatellite markers revealed 6 different clusters according to the ploidy, the niche of origin of the isolates and geographical origin of the strains (Albertin et al., 2014; Avramova et al., 2018b). At a large scale, a diploid-triploid complex for *Brettanomyces bruxellensis* was reported with 57.8% of the

* Corresponding author. Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Sciences Agro, OENO, UMR 1366, ISVV, 33140, Villenave d'Ornon, France.
E-mail address: paul.le-montagner@u-bordeaux.fr (P. Le Montagner).

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104217>

Received 5 October 2022; Received in revised form 11 January 2023; Accepted 17 January 2023

Available online 18 January 2023

0740-0020/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

isolates showing more than 2 alleles for at least one locus. Later, genomes sequence analysis of *B. bruxellensis* validating previously defined populations (Borneman et al., 2014; Gounot et al., 2020; Eberlein et al., 2021); six sub-groups can be considered, two diploids and four triploids (Harrouard et al., 2022). Indeed, among diploids clusters, one group is composed of isolates from wine and the other is associated with kombucha, beer and wine isolates. For triploids clusters, one group gathered beer and wine isolates, one group bioethanol and tequila isolates and the two other groups are strongly associated with winemaking. In addition, a link was highlighted between sulphite tolerance (SO₂) and triploid wine groups indicating adaptation of specific branches *B. bruxellensis* species to the environmental conditions and human activity (Curtin et al., 2012; Avramova et al., 2018a; Harrouard et al., 2022). This may be the result of the recurrent use of high doses of sulphur dioxide to control the population of *B. bruxellensis* thus resulting in the selection of resistant/tolerant strains to the applied doses (Curtin et al., 2012). Ecological studies have shown that *B. bruxellensis* can be present throughout the winemaking campaign from year to year, thus showing a persistence in the cellar (Bokulich et al., 2013; Cibrario et al., 2019). In a given winery, some strains have been isolated from the wines over 80 vintages, suggesting that cellar could be the first source of contamination (Cibrario et al., 2019). Indeed, many studies have highlighted the presence of *B. bruxellensis* in the cellar. Its presence was reported on the surface of the walls and in the air but also on the small materials and equipment's of the winery, the tanks, pumps and wastewater then showing the possible dispersal of *B. bruxellensis* in the winemaking environment (Fugelsang, 1997; Connell et al., 2002). The recurrent presence of *B. bruxellensis* in the cellar and equipment suggest specific properties of the species to persist and survive in this environment. The ability to bioadhere and to form biofilms has been previously cited as a key property for the persistent colonization of food processing environment and materials (Bridier et al., 2015). Indeed, yeasts can adhere to different surfaces and initiate biofilm formation (Verstrepen and Klis., 2006). The biofilm lifestyle is the way of life preferred by microorganisms in natural environment (Davey and O'Toole, 2000; Tek et al., 2018). Biofilm is defined as a structured community of microorganisms adhered to a surface and producing an extracellular matrix. This lifestyle brings several advantages to the microorganisms such as a higher resistance to environmental conditions (temperature, pH, alcohol, humidity ...) but also to the treatments that can be applied to it (antibiotics, chemicals, heat ...) (Davey and O'Toole, 2000; Bastard et al., 2016). The formation of a biofilm involves several key steps such as bioadhesion, maturation and dispersion. The bioadhesion is the first and more important step in the formation of a biofilm and it is closely related to the hydrophobic and van der Waals interactions that will be established between the yeast and the surface of the material (Blanco et al., 2010). These interactions are defined according to the physico-chemical surface properties resulting from the membrane composition of the cell. These surface properties are also mediated by gene expression, particularly those of the *FLO* family (van Mulders et al., 2009). These genes in *Saccharomyces cerevisiae* encode surface adhesins and flocculins that impact surface physico-chemical properties and are regulated by environmental factors (Guo et al., 2000; van Holle., 2012; Lenhart et al., 2019). In yeasts, the ability to form biofilms is proven in several areas, either in the medical field (*Candida albicans*) (Beckwith et al., 2022) or to produce biofuel (*Saccharomyces cerevisiae*) (Belini et al., 2020) with in most cases, negative impacts. In the food industry, and more particularly in the winemaking process, it is possible to find several biofilm-forming spoilage yeasts such as *Schizosaccharomyces pombe* or *Zygosaccharomyces bailii* (Zara et al., 2020). Concerning *B. bruxellensis*, little work has been done till now on the characterization of surface physico-chemical properties as well as on bioadhesion and the ability to form biofilm (Joseph et al., 2007; Tristezza et al., 2010; Ishchuk et al., 2016; Dimopoulou et al., 2019, 2021; Lebleux et al., 2020). In the previous cited studies, all the authors agreed that *B. bruxellensis* can adhere to different materials. The term biofilm was first mentioned in *B. bruxellensis* by

Joseph et al. (2007), who showed the ability to develop biofilm on polystyrene surfaces after a long incubation period without visual observations of biofilm organization. Lebleux et al. (2020) were the first to report the formation of biofilm in culture medium and wine in *B. bruxellensis* with the formation of cells with specific morphologies, namely chlamydo-spores. However, all the mentioned studies were conducted on a small number of strains with limited representation of genetic diversity. Therefore, our objective is to identify the variability of physico-chemical surface and bioadhesion properties of *Brettanomyces bruxellensis* on stainless steel. Considering the importance of *Saccharomyces cerevisiae* in the fermented food and wine industry, this species was included in our study as an outgroup.

2. Materials and methods

2.1. Strains and growth conditions

A total of 54 strains of *B. bruxellensis* representative of the genetic diversity of the species were used in this study (Avramova et al., 2018a) (Table S1). These strains originated from different geographical areas. They were also isolated from different substrates and are part of the CRBO collection (Microbiological Resources Center Oenology, Bordeaux, France), the UWOPS collection (Culture collection of the University of Western Ontario, London, Canada), the AWRI collection (Australian Wine Research Institute, Adelaide, Australia), the GSP collection (Foggia University), the YJS collection (Laboratory for Molecular Genetics, Genomics and Microbiology, Strasbourg University) and CBS-KNAW collection (Fungal Biodiversity Center, Utrecht, Netherlands). In the present study, the beer group was separated according to the strain's substrate of origins, wine (Beer 1) and beer (Beer 2). Furthermore, 5 industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* (IOC 18 2007, ACTIFLORE® BO213, ZYMAFLORE® XPURE, ACTIFLORE® F33 and ZYMAFLORE® VL2) were used as an outgroup to compare the bioadhesion properties. The *B. bruxellensis* strains were stored at -80 °C in a mixture of YPD 70% comprising 2% (w/v) glucose (Fisher Bio-Reagent™), 1% (w/v) yeast extract (Fisher BioReagent™), 1% (w/v) peptone (Gibco) and glycerol 30% (v/v) before being cultured on a YPD solid medium (2% (w/v) agar Fisher BioReagent™) and are incubated for 5 days at 25 °C.

2.2. Growth and adaptation protocol

A standard liquid wine medium called Wine Like Medium (WLM) that mimics wine composition was used for the yeast growth (standard protocol). This medium was chosen because it supports the growth of a collection of 39 *B. bruxellensis* strains better than YPD medium (see below). WLM is composed of 0.05% (w/v) glucose (Fisher Bio-Reagent™), 0.15% (w/v) fructose (Sigma Aldrich®), 0.2% (w/v) tartaric acid (Prolabo), 0.05% (w/v) citric acid (Prolabo), 0.03% (w/v) malic acid (Aldrich Chemistry), 0.25% (w/v) yeast extract (Fisher Bio-Reagent™), 0.5% (w/v) glycerol (Sigma Aldrich®) and 10% (v/v) absolute ethanol (VWR Chemicals®). The pH is adjusted to 3.6 with KOH. Adaptation steps are necessary in order to adapt yeasts to the WLM medium. Briefly, few colonies were recovered from solid medium and transferred into 10 mL of a mixture consisting of 25% (v/v) of WLM medium and 75% (v/v) of liquid YPD medium (2% (w/v) of glucose, 1% (w/v) of yeast extract and 1% (w/v) of peptone for 48 h of incubation at 25 °C under stirring at 180 rpm. This adaptation step was repeated 3 times and the proportion of WLM was gradually increased (50%, 75% and finally 90%). After 48 h of incubation (25 °C, 180 RPM), the cell culture was collected to perform filamentous growth, surface charge and bioadhesion analysis. For growth in red wine, adaptation steps were also necessary. Few colonies were recovered from solid medium and transferred into 10 mL of a mixture consisting of 25% (v/v) of red wine (Graves, 12.5% vol, pH 3.7) and 75% (v/v) of grape juice, and incubated for 48 h (25 °C, 180 RPM). This adaptation step was repeated 3 times

and the proportion of red wine was gradually increased (50%, 75% and finally 90%).

2.3. Filamentous growth (pseudohyphae)

The cell culture was sampled (1 mL) to evaluate the proportion of pseudohyphae. The sample was filtered on 0.4 µm filter (Isopore™). The filter was then placed on a pad containing a mixture of ChemSol B16 (Chemunex) buffer containing 1% (v/v) of fluorochrom V6 (Chemunex), and the pad was incubated 30 min in the dark at 30 °C. The proportion of pseudohyphae was evaluated by epifluorescence microscopy (10 fields of vision counts).

An observation by confocal microscopy was also performed to see the cell morphology (Bordeaux Imaging Center Bordeaux platform of the INRAE plant pole). The dyes used were 5(6)-Carboxyfluorescein Diacetate (CFDA) (Thermo Fisher Scientific) for cell viability and 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Fisher Scientific) for nucleus coloration. Observations were made using the immersion lens. Confocal acquisitions were realized using a Zeiss LSM 880 confocal laser-scanning microscope with a diving 63× objective with a numerical aperture of 1. The excitation wavelengths and emission windows were 488 nm/450-490 nm and 488 nm/588-669 nm, for DAPI and CFDA respectively.

2.4. Physico-chemical properties of stainless steel

As a model material currently used in the wine industry, stainless steel 316 L (SS) (Goodfellow) was chosen for the bioadhesion assays.

2.4.1. Cleaning procedure of the coupons

The coupons were placed for 5 min in a bath of water and acetone (50:50) to remove adhesive and then they were placed for 5 min in a bath of 70% ethanol for the disinfection. The coupons were then rinsed with distilled water and dried with optical paper.

2.4.2. Wettability of the coupons

After cleaning, some SS coupons were immersed 3 h at room temperature in WLM or Bordeaux red wine (Graves appellation, 2019), rinsed once in distilled water then dried 1 h under a flow cabinet. Contact angle measurements (θ) were performed using sessile drop method by deposition of a test liquid droplet onto the dry samples and measurements were carried out under atmospheric condition at room temperature using a goniometer DSA 100 (KRÜSS, France). At least three samples were used and contact angle measurements were performed on at least eight positions on each sample.

2.4.3. Surface free energy

Surface free energy of stainless steel (SS) was determined from contact angles (θ) of water (Milli-Q-Millipore) and diiodomethane (Sigma, France) using sessile drop technique combined with the Young-Owens et Wendt equation. In this approach, the pure liquid (L) contact angle (θ) is expressed as follows:

$$\cos \theta = -1 + \frac{2(\gamma_S^D + \gamma_L^D)^{\frac{1}{2}}}{\gamma_{LV}} + \frac{2(\gamma_S^P \gamma_L^P)^{\frac{1}{2}}}{\gamma_{LV}} \quad (1)$$

where γ^D denotes the Dispersive-Lifshitz-van der Waals component of surface free energy, γ^P the polar components of surface free energy. The total surface free energy (γ) was defined, respectively, by:

$$\gamma = \gamma^D + \gamma^P \quad (2)$$

2.5. Analyses of the physico-chemical properties of the cells surfaces

2.5.1. Surface charge determination

The measurement of the surface charge was carried out by centrifuging the cell culture at 7000 g for 5 min at room temperature and then

the cell pellet was washed twice in ultra-pure water at pH 3.6. Cell pellet is then resuspended in ultra-pure water at pH 3.6 filtered on nylon filter (0,45 µm) to obtain a cell suspension with a OD_{600nm} around 0.7. The measurement of the zeta potential was carried out via the Zetasizer Nano (Malvern). For each strain, three measurements were made on the same cell culture.

2.5.2. Microbial adhesion to solvents (MATS)

This technique makes it possible to determine the hydrophilic/hydrophobic character present on the surface of yeasts (Bellon-Fontaine et al., 1996). Ten milliliters of cell suspension were centrifuged for 5 min at 7000 g at room temperature then the pellet was washed twice with distilled water and were resuspended in physiological water (NaCl 0.9%) to obtain a cell suspension with an OD_{600nm} around 0.7. 1.5 mL of cell suspension were mixed with 250 µL of two solvents, chloroform (Fisher Chemical) or hexadecane (Sigma-Aldrich). The mixture was vortexed for 2 min to create an emulsion. Then a rest period of 15 min allowed the separation of the 2 phases. The optical density of the cell suspension (OD_0) and the aqueous phase of the mixture (DO) were measured at 600 nm. The affinity for each solvent was calculated using the following formula:

$$\% \text{ affinity} = \left(1 - \frac{OD}{OD_0} \right) \times 100$$

For each strain and solvent, three independent measurements were carried out on the same cell culture.

2.6. Bioadhesion

2.6.1. Confocal microscopy

To perform the bioadhesion, the cell culture was centrifuged for 5 min at 7000 g at room temperature and then the cell pellet was washed twice with physiological water (NaCl 0.9%). The pellet was then resuspended in 20 mL of a mixture WLM 90% and YPD 10% and adjusted to obtain a final concentration of 10^7 cells/mL. The bioadhesion was made on 316 L stainless steel coupons of dimension 14 mm × 25 mm (Goodfellow). The coupons were cleaned according to the procedure described in 2.4.1 section. The rinsed coupons were placed in Petri dishes with a diameter of 55 mm 10 mL of cell suspension was then added to the Petri dishes to initiate bioadhesion. The bioadhesion was carried out for 3 h at room temperature.

The quantification of bioadhesion was performed by confocal microscopy. After the 3 h of bioadhesion, a coupon washing step was performed to remove the non-adherent cells that had sedimented. This step consists of 5 successive cleaning baths in a sterile container containing physiological water. The coupon was then placed in a solution of Chemsol B15 (Biomérieux) containing 1% (v/v) of 5(6)-Carboxyfluorescein Diacetate (CFDA) (Thermo Fisher Scientific) at 8 mg/mL and 0.2% (v/v) propidium iodide (PI) at 1 mg/mL (Thermo Fisher Scientific) with a standby time of 15 min. The surface of the coupon was observed by confocal microscopy within the Bordeaux Imaging Center Bordeaux platform of the INRAE plant pole. Observations were made using the immersion lens. Confocal acquisitions were realized using a Zeiss LSM 880 confocal laser-scanning microscope with a diving 40× objective with a numerical aperture of 1. The excitation wavelengths and emission windows were respectively 488 nm/499–553 nm and 561 nm/588–688 nm for CFDA and propidium iodide. Fluorochromes were detected sequentially line by line. The adhered cells were counted by the mean of 10 fields of vision counts.

2.6.2. Enumeration of bioadhered cells by cultivation

The enumeration of viable cells was carried out after the 3 h of bioadhesion (see bioadhesion protocol in part 2.6.1). The coupon was cleaned from the no adhered cells by 5 successive washes in sterile physiological water (NaCl 0.9%). The coupon was then placed in a 50

mL tube containing 20 mL of sterile physiological water (NaCl 0.9%) and then the whole suspension was placed 2 min in sonication at 47 Hz. After this sonication step the tube was stirred at maximum speed for 40 s. Dilutions series were then carried out and 100 μ L of the suspension were inoculated in triplicate on YPD agar medium. The result is then expressed as Colony Forming Unit per cm² (CFU/cm²).

2.6.3. Scanning electron microscopy (SEM)

Brettanomyces bruxellensis cells were adhered on stainless steel coupon from WLM culture at 10⁷ cell/mL for 3 h. The adhered cells were fixed on the stainless-steel coupon by a solution of 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer of pH 7.2 over one night at 4 °C. The coupon was washed with 0.05 mM phosphate buffer for 10 min. Two successive immersions were performed for dehydration for 10 min in solutions of increasing ethanol content (50, 75, 90, 100%). The coupon was placed in solution of ethanol-acetone (70/30, 50/50, 30/70, 100%) for 10 min. Next, the coupon was air-dried and stored at room temperature. The sample were coated with a thin platinum layer and then observed with a Zeiss Gemini 300 scanning electron microscope. SEM was performed using a working distance between 7.9 mm and 8.0 mm.

2.7. Statistical analysis

Kruskal-Wallis statistical test (agricolae package, R, p value < 0.05), Anova 1-way (p-value < 0.05), Student t-test (p-value < 0.05), Spearman test (p-value < 0.05) and Principal Component Analysis (PCA) were performed using R and R-packages *agricolae* (Mendiburu, 2021), *ade4* (Dray and Dufour, 2007).

3. Results

3.1. Validation of the experimental protocols

3.1.1. 316 L stainless steel properties

After a 3 h-fouling of red wine or WLM, stainless steel coupons were dried, and their wettability was determined. Contact angle measurements and surface free energies calculations showed that cleaned SS coupons exhibited hydrophobic and apolar properties (Table S2) illustrated by a high contact angle (104.3°) and very low polar components (0.01). After contact with red wine or WLM, surfaces exhibited *i*) an hydrophilisation illustrated by the decrease of the water contact angles and *ii*) polar properties with polar components of 7.6 and 9.9, for SS fouled with red wine and WLM, respectively. Hence, red wine and WLM appeared to influence similarly the physico-chemical properties of stainless-steel coupons. Moreover, surface tension of both liquids was found similar, *ie* 46.1 and 50.3 mN m⁻¹ respectively for red wine and WLM (data not shown). All together, these results showed that WLM is a relevant model medium for red wine in bioadhesion assays, causing similar surface properties after fouling of stainless steel.

3.1.2. Repeatability of physico-surface properties, bioadhesion and pseudohyphae assays

For each series of analysis, the CBS2499 strain was used as control strain to evaluate the repeatability of the analysis. Eight independent series of triplicate were performed. The standard deviations obtained for the MATS and zeta potential analysis are low showing robustness and repeatability of the method (Table S3). For both bioadhesion and cultivability, the standard deviation obtained was one 10-fold lower than the bioadhesion value showing good repeatability.

3.2. Filamentous growth (pseudohyphae)

In our experimental conditions, the presence of specific filamentous growth was observed for 65% of *B. bruxellensis* isolates. These cells are characterized by the absence of separation between the mother and daughter cells, which generates a filament of cells. The observation of

branching on filamentous cells shows the ability of the cells to initiate several axes of budding (Fig. 1A). Observation by confocal microscopy using DAPI that binds region rich in nucleic acids confirms that each cell has its own nucleus, thus suggesting that filamentous cells of *B. bruxellensis* are indeed true pseudohyphae cells (Fig. 1B). The proportion of pseudohyphae cells was determined by epifluorescence microscopy on the 54 strains analyzed after 48 h of incubation at 25 °C under stirring at 180 rpm. The values obtained showed high variability depending on the strains tested, ranging from 0 to 38.3% (Fig. 2A) and 35 strains of *B. bruxellensis* (65% of the strains) showed specific filamentous growth. Indeed, the proportion of pseudohyphae varied significantly according to genetic groups and ploidy level. Ploidy level significantly impacts the proportion of pseudohyphae, with 4.74% and 1.92% for the triploid and diploid group, respectively (Kruskal-Wallis, p-value < 0.05) (Fig. 2B). The group with the highest proportions was the triploid Teq/EtOH group with 16.1% in average of pseudohyphae cells. The highest proportions of pseudohyphae cells (up to 38% of the strain culture) was obtained for the strain CRBOL17109 belonging to the Teq/EtOH group (Fig. 2A). The size of the pseudohyphae varied from one filament to another; however, 30 μ m seems to be an average length for the majority of producing strains. The genetic groups Wine 1 and Beer 2 have low pseudohyphae cell proportions but frequencies as important as the Teq/EtOH and Beer 1 groups. In addition, the Wine 2 and Wine 3 groups showed the lowest frequencies with 1.4% and 0.02% in average of pseudohyphae cells, respectively. Of the 10 strains of the Wine 3 group tested, only 3 strains presented pseudohyphae cells with rather low proportions. Regarding the 5 strains of *S. cerevisiae* tested during this study, none of them showed an ability to produce filamentous growth (Fig. 2A).

3.3. Surface properties

The surface charge of the 54 *B. bruxellensis* strains and 5 *S. cerevisiae* strains was measured on the same cell suspension after adaptation steps at a pH close to wine (pH 3.6) and alcohol content of 10% (WLM medium). The surface charge was evaluated through the zeta potential. In our experimental conditions, *S. cerevisiae* showed a significant (Student-test, p-value < 0.05) higher negative surface charge (-32.1 ± 2.74 mV) compared to *B. bruxellensis* (-24.47 ± 6.21 mV). The values obtained revealed a negative surface charge for all the *B. bruxellensis* strains tested, with significant variations depending on the genetic groups (Fig. 3). Wine 1 group had the highest electronegativities (-33 ± 2.2 mV) with a maximum value reaching at -36 mV for strains CRBOL14190 and CRBOL14156 similar to *S. cerevisiae*. The Beer 1 group also had significant electronegativity values (-27 ± 4.3 mV). The Wine 2, Teq/EtOH and Kombucha groups had similar values with a surface charge of -22 ± 2.0 ; -22 ± 2.1 , -21 ± 1.2 mV, respectively. The Beer 2 group had the lowest electronegativities (-15.8 ± 4.4 mV).

Using the MATS method, the hydrophilic/hydrophobic character of all strains was also tested through their affinity to non-polar solvents, chloroform and hexadecane, respectively. In view of the results obtained, the affinity of *B. bruxellensis* strains for solvents varies from 0 to 99%, again reflecting high intraspecific variability. The general behavior of the strains was similar between the two solvents: a significant plot correlation has been shown between hexadecane and chloroform data (Spearman test, p-value < 2.2e-16, $r = 0.848$). For *S. cerevisiae*, the affinity varied from 0 to 21%. Forty-four yeast strains studied had an affinity to chloroform lower than 50% (Fig. 4A). In addition, strains belonging to the Beer 1 group showed higher chloroform affinities of up to 90% affinity for CRBOL1120 reflecting basic polar cell surface. The Wine 2, Beer 2, Kombucha and Wine 3 groups exhibit low affinity to chloroform apart from strain CBS2499 which has an affinity of 93%.

For hexadecane, 10 strains had an affinity higher than 30%. The affinities of the Wine 1 and Beer 1 groups are lower except for strain CRBOL1120 which has an affinity to hexadecane of 99% (Fig. 4B). The CBS2499 strain of the Wine 3 group also has a high affinity (95%)

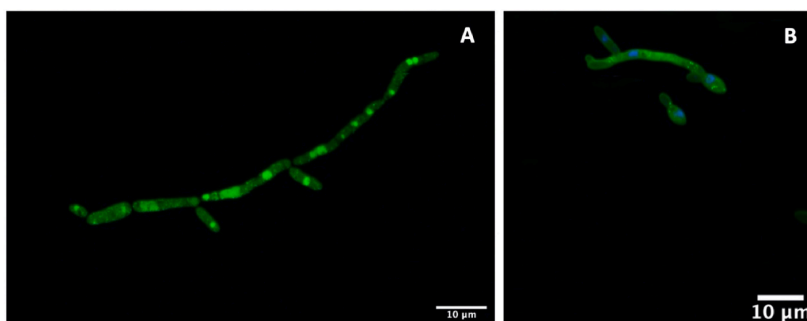


Fig. 1. Pseudohyphae cells observed by confocal microscopy with dye viability (A); Pseudohyphae cell observed by confocal microscopy with different dyes (DAPI for nucleus and CFDA for live cells) (B).

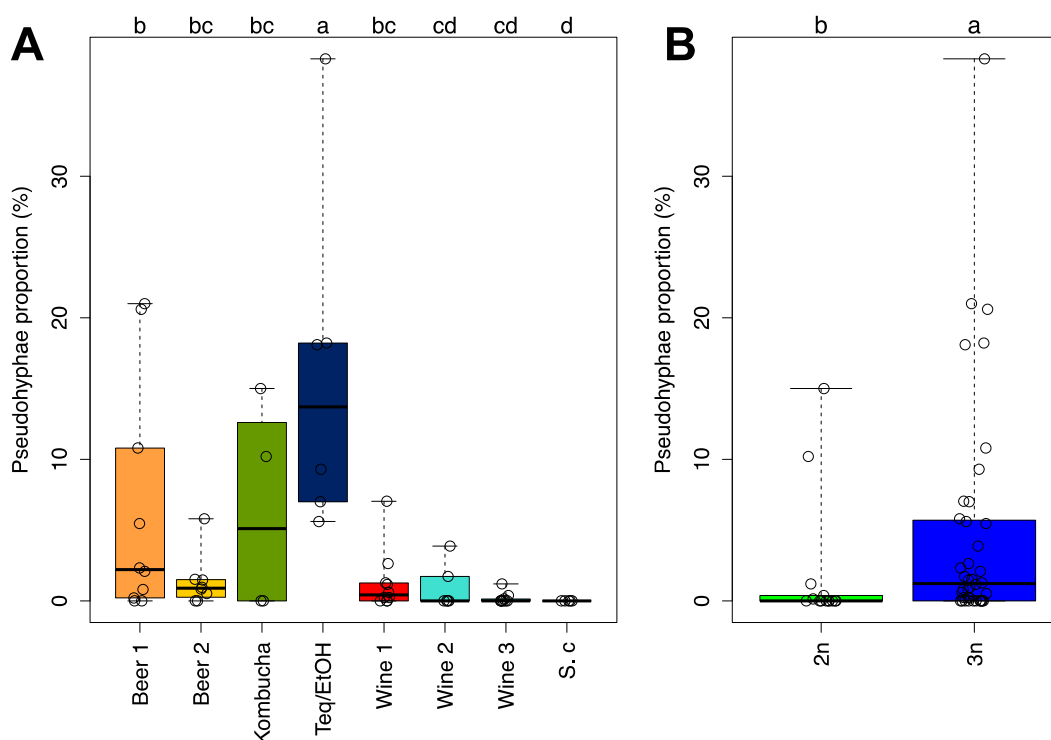


Fig. 2. Proportion of pseudohyphae cells for the 54 strains. The colors represent the genetic groups of *Brettanomyces bruxellensis* (A). Pseudohyphae proportion according to the ploidy of *B. bruxellensis* (B). Upper letter represents groups significantly different as defined by Kruskal-Wallis statistical test (Agricolae package, R, p value < 0.05).

indicating hydrophobic behavior (outlier). For the 2 solvents, no significant differences are observed between *B. bruxellensis* and *S. cerevisiae* at the species level. Overall, the tested strains of *B. bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae* therefore exhibit a predominantly hydrophilic behavior.

3.4. Bioadhesion

Observations of bioadhered cells by confocal microscopy on stainless steel 316 L after 3 h have shown high viability of the yeast cells and variable bioadhesion abilities depending on the genetic group. Morphological variability within bioadhered cells is also revealed. Indeed, *B. bruxellensis* has different morphologies depending on the strain studied. Spherical, ovoid cells were observed (Fig. 5A) and even

pseudohyphae cells (Fig. 5B), thus demonstrating their capacity to bioadhere to stainless steel material. This morphological variability was also observed in Scanning Electron Microscopy where observations of bioadhered pseudohyphae were made (Fig. 6A). SEM observation also showed that, after 3 h of bioadhesion, interactions are established by physical contact with stainless steel and between cells. It is also possible to see structures established between cells and with support (white arrows Fig. 6). There is therefore in addition to cell-support adhesion a cell-cell adhesion (Fig. 6B). After 3 h of bioadhesion on stainless steel, the minimum adhered population density was 2.2×10^2 cell/cm² for the CRBOL1781 strain of the Wine 2 group while the maximum was 7.6×10^6 cell/cm² for the YJS5400 strain of the Beer 1 group (Fig. 7A). The most bioadhesive genetic groups were the Beer 1 and Beer 2 groups ($3,2 \times 10^6$ cell/cm² and $9,16 \times 10^5$ cell/cm², respectively), in which all

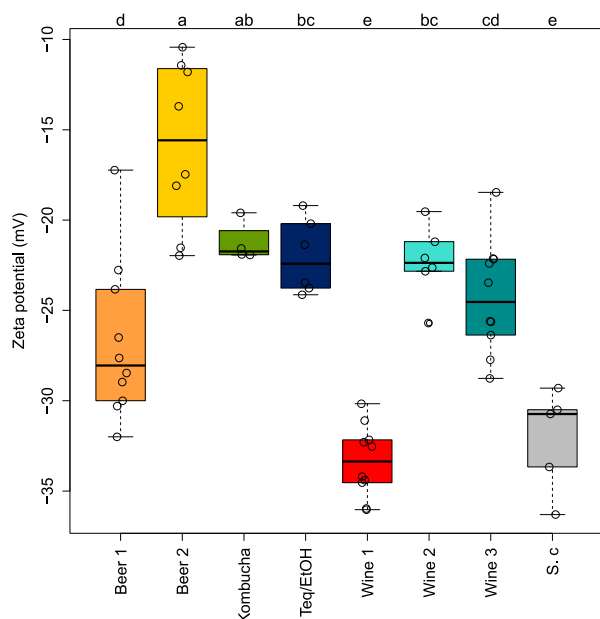


Fig. 3. Zeta potential of the 54 strains of *Brettanomyces bruxellensis*. The different colors represent genetic groups. Upper letter represents groups significantly different as defined by Kruskal-Wallis statistical test (Agricolae package, R, p value < 0.05).

strains produced adhered population densities higher than 10^4 cell/cm². On the other hand, the Wine 2, Kombucha and Wine 3 genetic groups displayed the weakest bioadhesion capacity. A significant difference between triploid and diploid strains was shown (p-value >0.05) (Fig. S1A) with higher capacity for triploid strains to bioadhere compared to diploid strains. At the species level, bioadhesion

observation did not show significant differences between *B. bruxellensis* and *S. cerevisiae* (p-value >0.05). Indeed, *S. cerevisiae* exhibits a bioadhesion behavior like the Wine 1 and Teq/EtOH and Beer 2 groups.

The population of cultivable cells liberated from the coupon by sonication was maximal for the Beer groups (Beer 1 and Beer 2) with a maximum for the CRBOL1120 strain with 1.2×10^6 CFU/cm² (Fig. 7B). Similar genetic group ranking was obtained whether the criterion was enumeration by cultivation after sonication or direct cells count by confocal microscopy. The ploidy effect is also present for cultivable cells with a higher concentration for triploid strains due to a higher concentration of bioadhered cells (Fig. S1B). Furthermore, cultivable observation did show significant differences between *B. bruxellensis* and *S. cerevisiae* (p-value >0.05). In addition, *S. cerevisiae* exhibits similar enumeration counts of bioadhered cells than the Beer groups (data not show).

3.5. PCA of the combined data

Principal component analysis was performed to establish correlations between surface properties, bioadhesion and pseudohyphae growth. Principal component analysis of the combined data is given in Fig. 8. The data obtained for the WLM matrix are given in Table S3. In PCA, the dimension 1 represents 49.7% of the total variation from the original data set and mainly explains the affinity to solvent, bioadhesion and cultivable capacity. The dimension 2, which represents 18% of the total variation from the original data set, mainly explained the production of pseudohyphae cells. Bioadhesion and cultivable capacities are correlated with high affinity to solvent and hydrophobic behavior. Some genetic groups like Kombucha, Wine 2, Beer 2 and Teq/EtOH are negatively correlated to solvent affinity, bioadhesion and cultivable and show similar behaviors. A separation of the strains of the Beer group depending on the substrate of origin is also noticeable; indeed, the 2 subgroups are separated along the dimension 1, with strains (n = 8) of the Beer 2 group closely gathered and negatively correlated with affinity to solvent and bioadhesion whereas strains (n = 7) from Beer 1 group showing the higher variability between its individuals with a greater

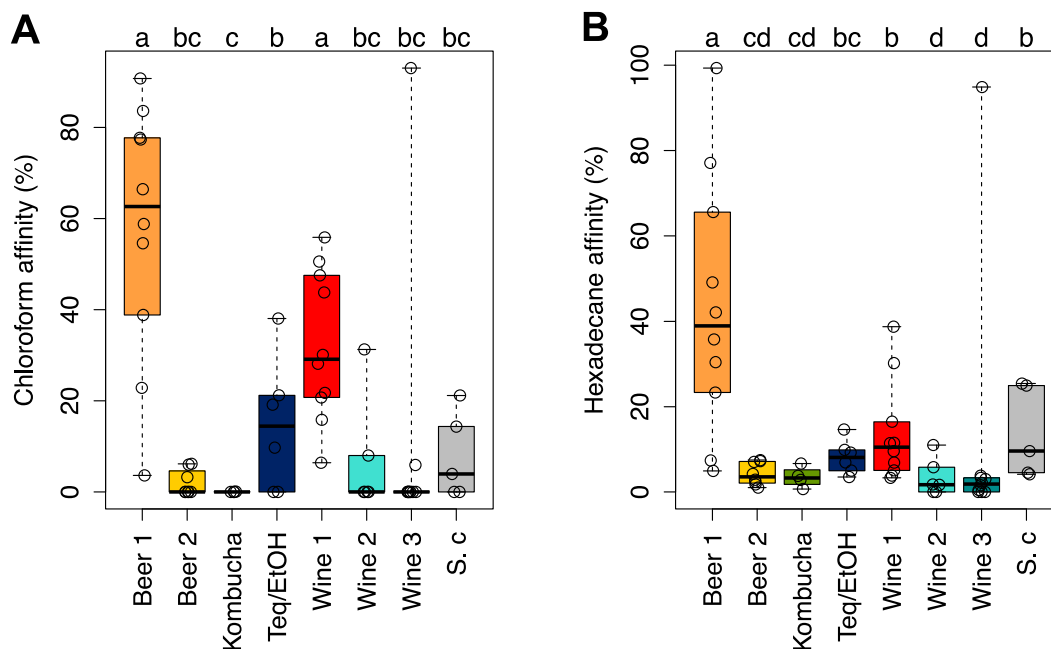


Fig. 4. Percentage of affinity to the chloroform and hexadecane used in the MATS analysis for the 54 strains studied (A) Chloroform and (B) Hexadecane. Upper letter represents groups significantly different as defined by Kruskal-Wallis statistical test (Agricolae package, R, p-value < 0.05).

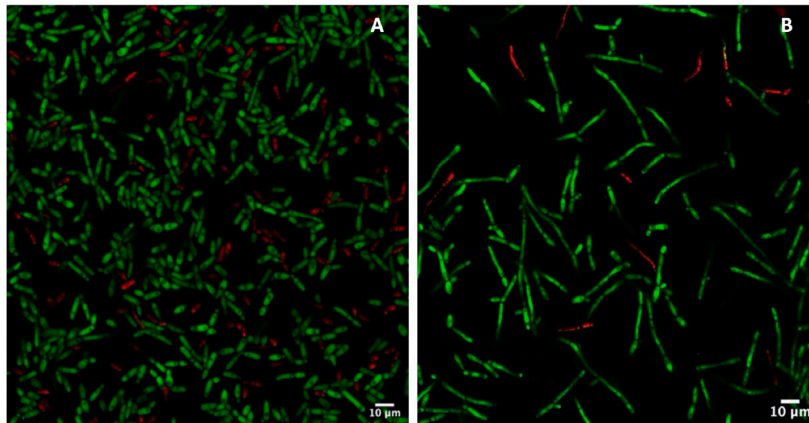


Fig. 5. Confocal microscopy observations after 3 h of bioadhesion of cells on SS. Image A represent ovoid cells and image B represent pseudohyphae cells. Different dyes were used, PI for dead cells (red) and CFDA for live cells (green).

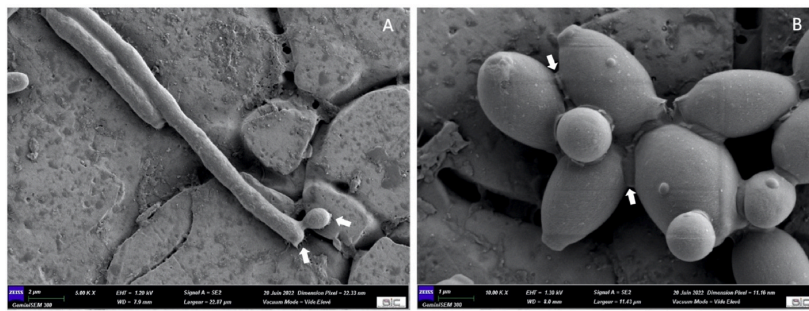


Fig. 6. SEM observation of 3 h-aged cells adhered on stainless steel chips in WLM. Magnifications were performed at 5000× for pseudohyphae observation(A) and 10000x for ovoid cells (B), White arrows represent hypothetical EPS.

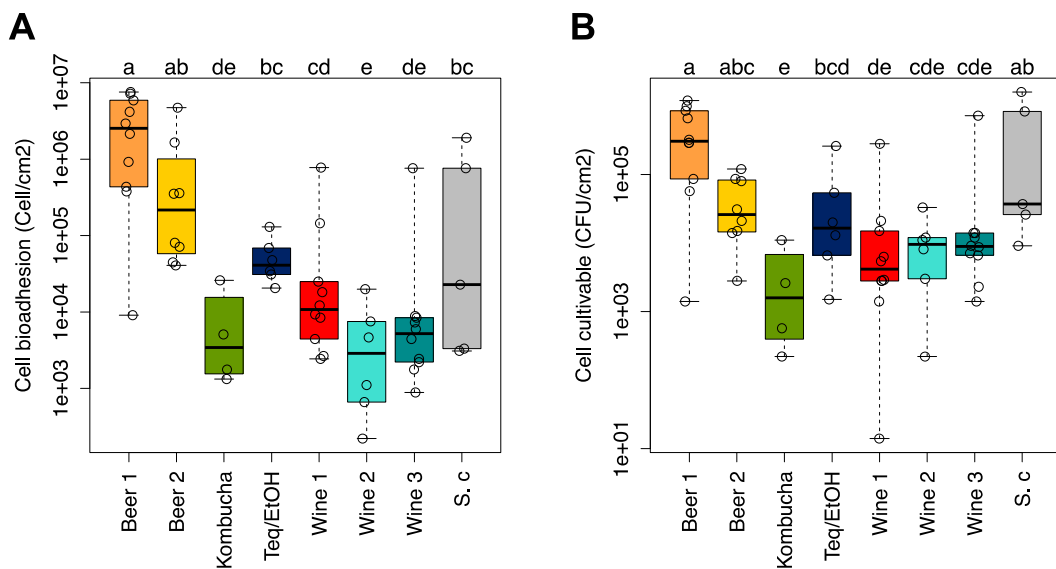


Fig. 7. Bioadhesion ability (A) and Cultivable capacity after bioadhesion (B) of the 54 strains after 3 h on SS. The color represents the genetic groups of the strains. Upper letter represents groups significantly different as defined by Kruskal-Wallis statistical test (agricolae package, R, p value < 0.05).

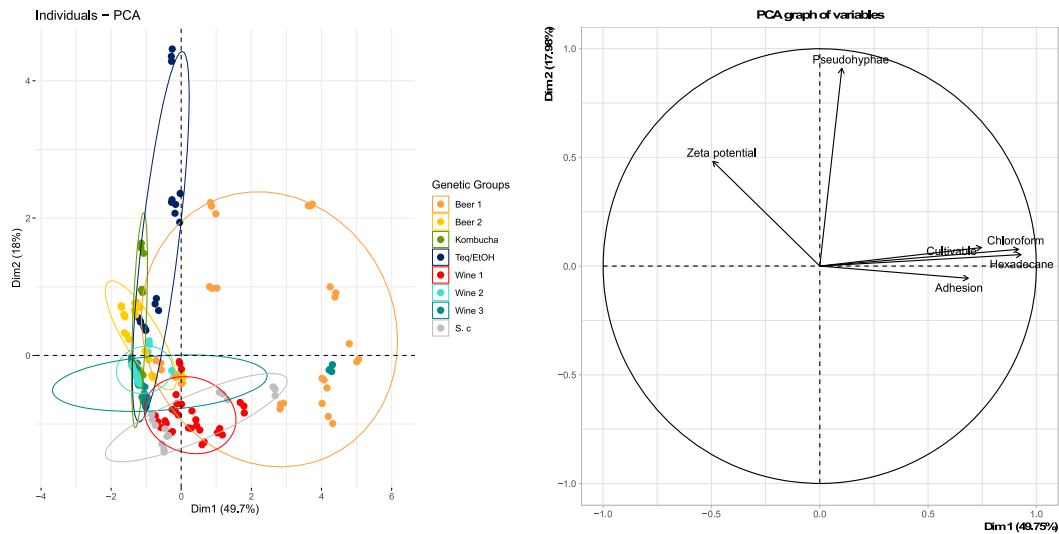


Fig. 8. Principal component analysis of the combined data (zeta potential, pseudohyphae, MATS, bioadhesion and Cultivable).

distribution and for some isolates (AWRI1608; AWRI1677; YJS5400; CRBOL1749 and ISA1700) a positive correlation with solvent affinity, bioadhesion and cultivable capacity. The CBS2499 strain of the Wine 3 group show a similar behavior to the strains of the Beer 1 group. Regarding *S. cerevisiae*, it is possible to see a behavior like the Wine 1 group but with 2 strains (F33 and IOC 18 2007) with significant bioadhesion and hydrophobic behavior.

3.6. Validation of physico-chemical properties of surface, bioadhesion and filamentous growth on a red wine matrix

The analysis of the surface physico-chemical properties and bioadhesion abilities within a wine matrix was carried out on a subgroup of 14 strains that had been previously analyzed on the WLM matrix. The analyses performed were the same as for the WLM matrix in order to be able to compare the 2 matrices. The data obtained for the wine matrix

are given in Table S4. Principal component analysis of combined data of wine and WLM experimentations is shown in Fig. 9. In PCA, the dimension 1 represents 52.5% of the total variation from the original data set and mainly explains the affinity to solvent, bioadhesion and cultivable counts. The dimension 2, which represents 18.1% of the total variation from the original data set, mainly explained the production of pseudohyphae cells. Bioadhesion and cultivable capacities are correlated with high affinity to solvent and hydrophobic behavior. Globally, combined data related to zeta potential, affinity to solvents, bioadhesion and cultivable counts in wine and in WLM are overlaid in PCA with the exception for Pseudohyphae. The combination of data obtained during experiments conducted on WLM or wine matrix shows that for the Beer, Wine 3 and Wine 1 groups the phenotypes measured are similar with superposed confidence ellipses (95%). Only the Teq/EtOH group shows different phenotypes between the 2 matrices due to the fact that no pseudohyphae form was observed in wine for all the strains tested. The

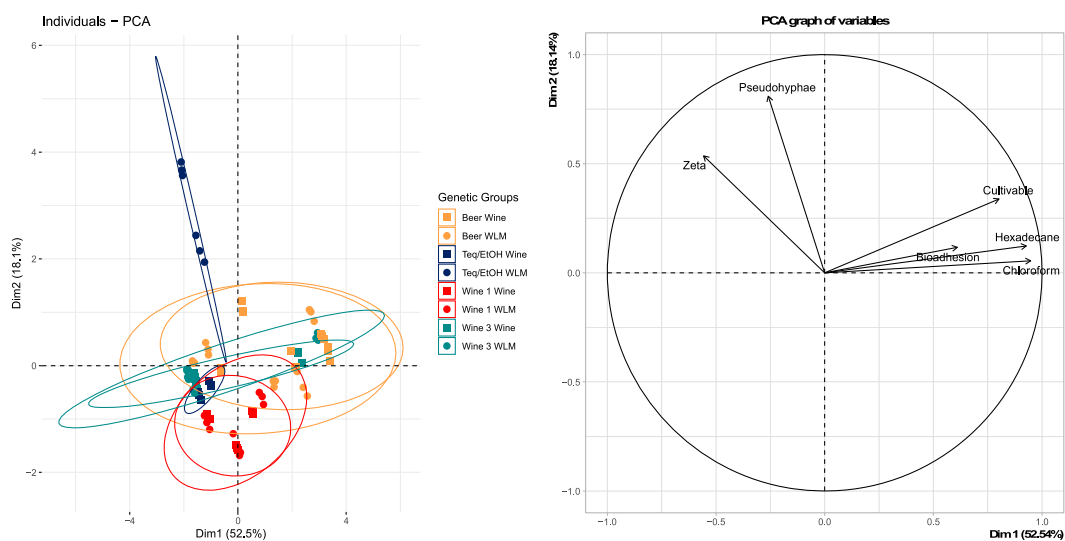


Fig. 9. Principal component analysis (PCA) of the combined data for wine and WLM experimentations (zeta potential, pseudohyphae, MATS and bioadhesion and cultivable).

cells observed in wine show ovoidal budding shapes. No differentiation into filamentous cells was observed in wine showing an impact of the medium on cell physiology. These results showed that WLM is a relevant model medium for red wine to assess surface and bioadhesion properties of *B. bruxellensis* in a context of the wine industry.

4. Discussion

In this study, different protocols were used to describe the physico-chemical, bioadhesion properties and filamentous growth of a subset of *B. bruxellensis* strains representative of the species genetic diversity (Avramova et al., 2018a, 2018b). We focused on bioadhesion phenomenon since it represents a crucial step in the biofilm formation. Indeed, the ability of *B. bruxellensis* to bioadhere and then form biofilm could be a potential resistance strategy (Lebleu et al., 2019) and could play a major role in the persistence of *Brettanomyces bruxellensis* in the cellar environment, and then recurrent wine contamination.

4.1. The ability to form pseudohyphae is a common feature in *Brettanomyces bruxellensis*

The pseudohyphae form is a cellular dimorphism described in several yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Hanseniaspora uvarum* (Lambrechts et al., 1996; Belini, V., 2021; Sudbery, P., 2001 and González et al., 2018) and is known in *S. cerevisiae* to be induced by environmental signals activating MAP-kinase and cAMP-dependent pathways regulating Flo11p (Rupp et al., 1999; Guo et al., 2000; Gancedo, J., 2001; Lenhart et al., 2019).

In our experimental conditions, no strains of *S. cerevisiae* produced pseudohyphae while 65% of strain of *B. bruxellensis* were able to form pseudohyphae cells with frequency depending on the genetic group and the ploidy level. These red wines spoilage species display a great adaptability to the stressful environmental conditions (Conterno et al., 2006). The formation of pseudohyphae cells could form part of the adaptation strategy of *Brettanomyces bruxellensis* but knowledge related to this cell morphology and the factors that induce it are still limited. Presence of sulfites in the culture medium can affect the presence of pseudohyphae cells in *B. bruxellensis* (Louw et al., 2016). Our results showed that triploid strains have higher ability to induce pseudohyphal cells than diploid strains. Similar observations have been reported in other yeast like *S. cerevisiae* where the ploidy affects the filamentous growth (Cullen and Sprague., 2012; Gancedo J., 2001). Indeed, according to the ploidy, different cell differentiations were observed in *S. cerevisiae*. In the case of diploid cells, in the presence of nitrogen starvation, pseudohyphal growth is considered while for haploid cells, a deficiency in carbon source will induce invasive growth (Cullen and Sprague., 2000, 2012; Lenhart et al., 2019). These facts would therefore explain the absence of pseudohyphal cells in *S. cerevisiae* under our conditions in view of the rich composition of the culture medium used. In our study, pseudohyphal cells was mainly observed for the Teq/EtOH genetic group. In Bioethanol process fermentations, an increase in the proportion of pseudohyphal cells was observed during the stationary phase, in connection with low ethanol production and a significant presence of residual sugars (Reis et al., 2013; Belini et al., 2020). In addition, the absence of pseudohyphae form in the wine matrix shows the impact of the medium on the phenotype. However, observations of pseudohyphal cells have already been made on wine matrix by Lebleux et al. (2020) with a longer contact time and on different strains. The presence of Quorum-Sensing molecules such as 2-phenylethanol could also explain the presence of these specific forms as they are known to induce pseudohyphal growth in some yeasts (González et al., 2018; Zhang et al., 2021).

4.2. Physico chemical properties of *B. bruxellensis* reveal a negative charge surface and contrasting solvent affinity

The negative surface charge measured for the *B. bruxellensis* strains studied could result from the cell wall composition. Indeed, the wall charge is directly influenced by the presence of wall proteins and polysaccharides (Hong and Brown, 2010; Halder et al., 2015; Dimopoulou et al., 2019; Lavaisse et al., 2019). The cell wall constitutes 10–25% of the cell volume, which has a major influence on cellular behavior (Klis et al., 2006; Vichi et al., 2010). In this study, all strains showed a negative surface charge the most negatively charged being the strains in Wine 1 group. Previous works in a rich medium has also shown that strains belonging to the Wine 1 genetic group were the most negatively charged while strains of the Beer groups were the least charged (Dimopoulou et al., 2019). In our case, related to the Beer group, the strains isolated from wine (Beer 1) have a negative charge close to that of the Wine 1 group while the strains isolated in beer (Beer 2) have the least negative surface charge. These results are correlated with other observations showing a negative yeast surface charge due to a high proportion of carboxylic and phosphodiester grouping in cell wall but also because the culture medium is acidic inducing protonation of amino groups (Tazhibaeva et al., 2003). These results indicate that depending on the genetic group and the origin of the isolates, the composition of the cell wall may differ and could impact the surface properties as well as the ability to colonize surfaces, bioadhere and induce growth in the form of biofilm (Sheppard and Howell., 2016). However, in our experimental conditions, no correlation was highlighted between the negative charge of the cells and the ability to bioadhere to stainless steel material.

Regarding to hydrophobicity, only the Beer 1 group has a significant affinity to the solvent and therefore a predominantly hydrophobic behavior. Conversely, the other genetic groups exhibit hydrophilic behavior. This trend has already been observed before in a rich culture medium, even for the orange group, which exhibited hydrophilic behavior (Dimopoulou et al., 2019). This difference could be explained by the fact that culture media are different between the two experiments. Natural adaptations by the cells are initiated to face up to culture conditions (Chrzanowski et al., 2008) and modifications in wall composition could explain the changes in surface charge for the Beer group and then hydrophobicity (Suzzi et al., 1994). In *S. cerevisiae*, the expression of genes of the *FLO* family and *FLO11* impacts on hydrophobicity (Mortensen et al., 2007; Govender et al., 2010, 2010; van Mulders et al., 2009). The genes of the *FLO* family have a major influence on cellular metabolism or surface properties. Yeasts with hydrophobic behavior have been shown to be able to adhere to negatively charged substrates such as plastic (Amaral et al., 2006; Blanco et al., 2008).

4.3. The ability of *Brettanomyces bruxellensis* to bioadhere to stainless steel surface is link to its hydrophobicity

Bioadhesion is the first mechanism of biofilm formation initiated by microorganisms in order to set up microorganism/support interactions. These interactions are directly related to the surface physico-chemical properties of the microorganism and of the support. Surface properties influence bioadhesion behavior because they are responsible for the first interactions between the cell and the surface (Verstrepen and Klis., 2006). In *Brettanomyces bruxellensis*, these bioadhesion abilities have already been demonstrated without giving precise information on morphology and arrangement (Dimopoulou et al., 2019; Ishchuk et al., 2016; Joseph et al., 2007). By using confocal and scanning electron microscopy, the number of viable bioadhered cells per cm² and their morphology on stainless steel chips after 3 h were obtained. The ability to bioadhere on stainless steel surface was reported for all the strains tested with first evidence for strains belonging to the Kombucha, Teq/EtOH and Wine 2 genetic groups. Significant differences between

the genetic groups ranging from 2×10^2 cell/cm² to 7.6×10^6 cell/cm² with a maximal average thickness of 8.61 μm were demonstrated after 3 h of bioadhesion. Similar observations on polystyrene plate also showed bioadhesion after 7 days for 12 strains tested with an average thickness of 9.2 μm and stationary bioadhered cell concentrations over 14 days (Lebleux et al., 2020). Indeed, the Beer group has the most important ability to bioadhere but also the most marked cellular surface hydrophobicity. Stainless steel is also hydrophobic even if the WLM medium reduces this hydrophobicity. Then, in our experimental conditions, the surface properties of stainless steel and the high cell surface hydrophobicity of the Beer group could explain its high ability to bioadhere. Our results suggest that in *B. bruxellensis*, hydrophobic interactions play a major role in bioadhesion as it has been previously reported for other species like *Candida albicans* (Blanco et al., 2010).

In *Saccharomyces cerevisiae*, bioadhered cells were also observed for all the strains tested. This ability has already been demonstrated in previous works with a correlation between hydrophobicity and abilities to colonize immediately charged surfaces (Urano et al., 2002; Verstrepen and Klis., 2006, van Mulders et al., 2009). Morphological diversity was observed with the presence of bioadhered pseudohyphae cells mainly for the Teq/EtOH group. This presence of bioadhered pseudohyphae cells would probably have an impact on bioadhesion and biofilm formation. Work on biofilm formation in *B. bruxellensis* has shown that the presence of pseudohyphae cells is identified at the base of the biofilm, showing that these specific forms play a major role during bioadhesion (Lebleux et al., 2020). Indeed, it has been shown that the presence of pseudohyphae forms in species of the genus *Candida* had an impact on the architecture during the formation of biofilm but also on the bioadhesion of other cells (Park et al., 2017; Kumari et al., 2018). In scanning electron microscopy, the nature of the structures that developed between cells and with stainless steel is currently unknown, but a hypothesis may be that these are made of exopolysaccharides as these polymers are reported to be involved in the consolidation of bioadhesion and biofilm formation (Czarczyk and Myszk, 2007). From a general point of view, bioadhesion is mediated via the expression of genes of the *FLO* family involved in several cellular mechanisms such as cell differentiation (pseudohyphal growth, invasive growth), flocculation and bioadhesion (Smit et al., 1992; Zhang et al., 2021). This gene family encodes membrane proteins with similarities to pathogenic fungi adhesins (Guo et al., 2000). The *FLO11* gene plays a central role in bioadhesion phenomena by encoding adhesins that will interact through hydrophobic interactions with the surface of materials allowing the establishment of bioadhesion (Reynolds and Fink., 2001, 2001van Mulders et al., 2009). Once the cells have reached a surface, flocculins encoded by *FLO* genes will come into play and allow cell-cell adhesion that can thus initiate the formation of biofilm (Guo et al., 2000). The recent publication of the genomes sequence of *B. bruxellensis* (Gount et al., 2020; Eberlein et al., 2021) opens the way to elucidate the underlying molecular mechanisms associated with pseudohyphal growth, bioadhesion and biofilm formation phenotypes in the species, in relation with ploidy level.

5. Conclusion

On a subset of strains representative of the genetic diversity of the species, this study highlighted different behaviors according to the genetic group indicating a high phenotypic variability whether at the morphological, cell surface properties or bioadhesion level. The surface properties defined by the composition of the cell play a central role in bioadhesion ability because they define the interactions that will take place between the cell and the surface. Differences in cell surface properties will therefore induce different bioadhesion and biofilm formation behaviors depending on the strain but also the genetic group. The results obtained show that the Beer group has the most marked bioadhesion capacity. This could imply a major risk of persistence in the cellar of these particularly bioadhesive strains at the origin of recurrent

wine spoilage. The specific detection of this genetic group in the cellar would be of importance for winemakers in order to adapt their cleaning protocols. Further research work on the impact of abiotic parameters and materials on bioadhesion properties would allow to better understand the factors favoring the persistence of *B. bruxellensis* in the wine environment.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Paul Le Montagner reports financial supports were provided by National Association of Technical Research and Biolaftort company.

Acknowledgments

The authors would like to thank Isabelle Svahn from the Bordeaux Imaging Center for providing help for the SEM images. The research was supported by Excell Laboratory and Biolaftort through ANRT.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104217>.

References

- Agnolucci, M., Tirelli, A., Coccolin, L., Toffanin, A., 2017. *Brettanomyces bruxellensis* yeasts: impact on wine and winemaking. World J. Microbiol. Biotechnol. 33 <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2345-z>.
- 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>.
- Amaral, P.F.F., da Silva, J.M., Lehocky, M., Barros-Timmons, A.M.V., Coelho, M.A.Z., Marrucho, I.M., Coutinho, J.A.P., 2006. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. Process Biochem. 41, 1894–1898. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.029>.
- 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 <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 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01260>.
- 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>.
- Beckwith, J.K., Ganesan, M., VanEpps, J.S., Kumar, A., Solomon, M.J., 2022. Rheology of *Candida albicans* fungal biofilms. J. Rheol. 66, 683–697. <https://doi.org/10.1122/8.0000427>.
- Belini, V.L., Junior, O.M., Ceccato-Antonini, S.R., Suhr, H., Wiedemann, P., 2021. Morphometric quantification of a pseudohyphae forming *Saccharomyces cerevisiae* strain using in situ microscopy and image analysis. J. Microbiol. Methods 190, 106338. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106338>.
- Belini, V.L., Suhr, H., Wiedemann, P., 2020. Online monitoring of the morphology of an industrial sugarcane biofuel yeast strain via in situ microscopy. J. Microbiol. Methods 175, 105973. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105973>.
- Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J., Van Oss, C.J., 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. Colloids Surf. B Biointerfaces 7, 47–53. [https://doi.org/10.1016/0927-7765\(96\)01272-6](https://doi.org/10.1016/0927-7765(96)01272-6).
- Blanco, M.T., Sacristán, B., Lucio, L., Blanco, J., Pérez-Giraldo, C., Gómez-García, A.C., 2010. Cell surface hydrophobicity as an indicator of other virulence factors in *Candida albicans*. Rev. Iberoam. De Micol. 27, 195–199. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.09.001>.
- Blanco, M.-T., Sacristán, B., Beteta, A., Fernández-Calderón, M.-C., Hurtado, C., Pérez-Giraldo, C., Gómez-García, A.-C., 2008. Cellular surface hydrophobicity as an additional phenotypic criterion applied to differentiate strains of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 60, 129–131. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.013>.

- Bokulich, N.A., Ohta, M., Richardson, P.M., Mills, D.A., 2013. Monitoring seasonal changes in winery-resident microbiota. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066437>.
- Borneman, A.R., Zeppel, R., Chambers, P.J., Curtin, C.D., 2014. Insights into the *Dekkera bruxellensis* genomic landscape: comparative Genomics reveals variations in ploidy and nutrient utilisation potential amongst wine isolates. *PLoS Genet.* 10 <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004161>.
- Bridier, A., Sanchez-Vizuete, P., Guilbaud, M., Piard, J.-C., Naitali, 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>.
- Carpena, M., Fraga-Corral, M., Otero, P., Nogueira, R.A., Garcia-Oliveira, P., Prieto, M. A., Simal-Gandara, J., 2021. Secondary aroma: influence of wine microorganisms in their aroma profile. *Foods* 10. <https://doi.org/10.3390/foods10010051>.
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.-n., Pons, M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* 60, 165–178. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740600205>.
- Chrzanoski, E., Bielicka-Daszkiwicz, K., Owsianiak, M., Aurich, A., Kaczorek, E., Olszanowski, A., 2008. Phenol and n-alkanes (C12 and C16) utilization: influence on yeast cell surface hydrophobicity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1943–1949. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9704-8>.
- Cibrario, A., Avramova, M., Dimopoulou, M., Magani, M., Miot-Sertier, C., Mas, A., Portillo, M.C., Ballestra, P., Albertin, W., Masneuf-Pomarede, I., Dols-Lafargue, M., 2019. *Brettanomyces bruxellensis* wine isolates show high geographical dispersal and long persistence in cellars. *PLoS One* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222749>.
- Connell, L., Stender, H., Edwards, C.G., 2002. Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 322–324.
- 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.
- Cullen, P.J., Sprague Jr., G.F., 2012. The regulation of filamentous growth in yeast. *Genetics* 190, 23–49. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127456>.
- Cullen, P.J., Sprague Jr., G.F., 2000. Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13619–13624. <https://doi.org/10.1073/pnas.240345197>.
- Curtin, C., Kennedy, E., Henschke, P.A., 2012. Genotype-dependent sulphite tolerance of Australian *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis* wine isolates. *Lett. Appl. Microbiol.* 55, 56–61. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03257.x>.
- Czaczyk, K., Myska, K., 2007. Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Pol. J. Environ. Stud.* 16, 799–806.
- 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>.
- Dimopoulou, M., Kefalloniti, V., Tsakanikas, P., Papanikolaou, S., Nychas, G.-J.E., 2021. Assessing the biofilm formation capacity of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis* through ftir spectroscopy. *Microorganisms* 9, 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030587>.
- Dimopoulou, M., Renault, M., Dols-Lafargue, M., Albertin, W., Herry, J.-M., Bellon-Fontaine, M.-N., Masneuf-Pomarede, I., 2019. Microbiological, biochemical, physicochemical surface properties and biofilm forming ability of *Brettanomyces bruxellensis*. *Ann. Microbiol.* 69, 1217–1225. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01503-5>.
- Dray, S., Dufour, A.-B., 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *J. Stat. Software* 22, 1–20. <https://doi.org/10.18637/jss.v022.i04>.
- Eberlein, C., Saada, O.A., Friedrich, A., Albertin, W., Schacherer, J., 2021. Different trajectories of polyplodization shape the genomic landscape of the *Brettanomyces bruxellensis* yeast species. *Genome Res.* <https://doi.org/10.1101/gr.275380.121>.
- Fugelsang, K.C., 1997. *Wine Microbiology*. Springer US, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6970-8>.
- Gammacurta, M., Marchand, S., Moine, V., de Revel, G., 2017. Influence of different yeast/lactic acid bacteria combinations on the aromatic profile of red Bordeaux wine. *J. Sci. Food Agric.* 97, 4046–4057. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8272>.
- Gancedo, J.M., 2001. Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 107–123. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00573.x>.
- González, B., Vázquez, J., Cullen, P.J., Mas, A., Beltran, G., Torija, M.-J., 2018. Aromatic amino acid-derived compounds induce morphological changes and modulate the cell growth of wine yeast species. *Front. Microbiol.* 9 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00670>.
- Gounot, J.-S., Neuvéglise, C., Freel, K.C., Devillers, H., Piskur, J., Friedrich, A., Schacherer, J., 2020. High complexity and degree of genetic variation in *Brettanomyces bruxellensis* population. *Genome Biology and Evolution* 12, 795–807. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa077>.
- Govender, P., Bester, M., Bauer, F.F., 2010. FLO gene-dependent phenotypes in industrial wine yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 931–945. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2381-1>.
- Guo, B., Styles, C.A., Feng, Q., Fink, G.R., 2000. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 12158–12163. <https://doi.org/10.1073/pnas.220420397>.
- Halder, S., Yadav, K.K., Sarkar, R., Mukherjee, S., Saha, P., Haldar, S., Karmakar, S., Sen, T., 2015. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *SpringerPlus* 4, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1476-7>.
- Harrouard, J., Eberlein, C., Ballestra, P., Dols-Lafargue, M., Masneuf-Pomarede, I., Miot-Sertier, C., Schacherer, J., Albertin, W., 2022. *Brettanomyces bruxellensis*: overview of the genetic and phenotypic diversity of an anthropized yeast. *Mol. Ecol.* <https://doi.org/10.1111/mec.16439>.
- Hong, Y., Brown, D.G., 2010. Alteration of bacterial surface electrostatic potential and pH upon adhesion to a solid surface and impacts to cellular bioenergetics. *Biotechnol. Bioeng.* 105, 965–972. <https://doi.org/10.1002/bit.22606>.
- Ishchuk, O.P., Zeljko, T.V., Schifferdecker, A.J., Wisen, S.M., Hagström, Å.K., Rozpedowska, E., Andersen, M.R., Hellborg, L., Ling, Z., Sibirny, A.A., Piskur, J., 2016. Novel centromeric loci of the wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis* CEN1 and CEN2. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161741>.
- 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.
- Klis, F.M., Boorsma, A., De Groot, P.W.J., 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 185–202. <https://doi.org/10.1002/yea.1349>.
- Kumari, A., Mankotia, S., Chaubey, B., Luthra, M., Singh, R., 2018. n.d. Role of biofilm morphology, matrix content and surface hydrophobicity in the biofilm-forming capacity of various *Candida* species. *J. Med. Microbiol.* 67, 889–892. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000747>.
- Lambrechts, M.G., Bauer, F.F., Marmur, J., Pretorius, I.S., 1996. MUC1, a mucin-like protein that is regulated by MSS10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 8419–8424. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8419>.
- Lathey, 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>.
- Lavaise, L.M., Hollmann, A., Nazareno, M.A., Disalvo, E.A., 2019. Zeta potential changes of *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and respiratory cycles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 174, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.001>.
- Lebleux, M., Abdo, H., Coelho, C., Basmaciyan, L., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Roullier-Gall, C., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., Weidmann, S., Rousseaux, S., 2020. New advances on the *Brettanomyces bruxellensis* biofilm mode of life. *Int. J. Food Microbiol.* 318 <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2019.108464>.
- Lenhart, B.A., Meeks, B., Murphy, H.A., 2019. Variation in filamentous growth and response to quorum-sensing compounds in environmental isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 9, 1533–1544. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400080>.
- 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. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 856–873. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.983591>.
- Lonvaud-Funel, A., 2016. Undesirable compounds and spoilage microorganisms in wine. In: *Wine Safety, Consumer Preference, and Human Health*, pp. 3–26. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24514-0_1.
- Louw, M., du Toit, M., Alexandre, H., Divol, B., 2016. Comparative morphological characteristics of three *Brettanomyces bruxellensis* wine strains in the presence/absence of sulfur dioxide. *Int. J. Food Microbiol.* 238, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2016.08.040>.
- Mendiburu, F. de, 2021. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*.
- Miljić, U., Puškaš, V., Vučurović, V., Muzalevski, A., 2017. Fermentation characteristics and aromatic profile of plum wines produced with indigenous microbiota and pure cultures of selected yeast. *J. Food Sci.* 82, 1443–1450. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13736>.
- Mortensen, H.d., Dupont, K., Jespersen, L., Willats, W.g. t., Arneborg, N., 2007. Identification of amino acids involved in the FLO1p-mediated adhesion of *Saccharomyces cerevisiae* to a polystyrene surface using phage display with competitive elution. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1041–1047. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03325.x>.
- Park, Y.-N., Srikantha, T., Daniels, K.J., Jacob, M.R., Agarwal, A.K., Li, X.-C., 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 <https://doi.org/10.1128/AAC.01319-17> e01319-17.
- Reis, V.R., Bassi, A.P.G., Silva, J.C.G. da, Ceccato-Antonini, S.R., 2013. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. *Braz. J. Microbiol.* 44, 1121–1131. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000020>.
- 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>.
- Reynolds, T.B., Fink, G.R., 2001. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291, 878–881. <https://doi.org/10.1126/science.291.5505.878>.
- Rubio, P., Garrijo, 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>.
- Rupp, S., Summers, E., Lo, H.-J., Madhani, H., Fink, G., 1999. MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene. *EMBO J.* 18, 1257–1269. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.5.1257>.
- Sheppard, D.C., Howell, P.L., 2016. Biofilm exopolysaccharides of pathogenic fungi: lessons from bacteria. *J. Biol. Chem.* 291, 12529–12537. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.720995>.
- Smit, G., Straver, M.H., Lugtenberg, B.J.J., Kijne, J.W., 1992. Flocculence of *Saccharomyces cerevisiae* cells is induced by nutrient limitation, with cell surface

- hydrophobicity as a major determinant. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3709–3714. <https://doi.org/10.1128/aem.58.11.3709-3714.1992>.
- Sudbery, P.E., 2001. The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Mol. Microbiol.* 41, 19–31. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02459.x>.
- Suzzi, G., Romano, P., Vannini, L., 1994. Cell surface hydrophobicity and flocculence in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2, 505–510. [https://doi.org/10.1016/0927-7765\(94\)80058-8](https://doi.org/10.1016/0927-7765(94)80058-8).
- Tazhibaeva, S.M., Musabekov, K.B., Orazymbetova, A.B., Zhubanova, A.A., 2003. Surface properties of yeast cells. *Colloid J.* 65, 122–124. <https://doi.org/10.1023/A:1022391613491>.
- 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>.
- Tempère, S., Marchal, A., Barbe, J.-C., Bely, M., Masneuf-Pomaredé, I., Marullo, P., Albertin, W., 2018. The complexity of wine: clarifying the role of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 3995–4007. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8914-8>.
- 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>.
- Urano, H., Nagata, K., Fukuzaki, S., 2002. Adhesion of *Saccharomyces cerevisiae* to alumina surfaces and its removal by caustic alkali cleaning. *Biocontrol Sci.* 7, 131–137. <https://doi.org/10.4265/bio.7.131>.
- Van Holle, A., MacHado, M.D., Soares, E.V., 2012. Flocculation in ale brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Re-evaluation of the role of cell surface charge and hydrophobicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 1221–1229. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3502-1>.
- Van Mulders, S.E., Christianen, E., Saerens, S.M.G., Daenen, L., Verbelen, P.J., Willaert, R., Verstrepen, K.J., Delvaux, F.R., 2009. Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 9, 178–190. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00462.x>.
- Verstrepen, 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>.
- Vichi, S., Gallardo-Chacón, J.J., Pradelles, R., Chassagne, D., López-Tamames, E., Buxaderas, S., 2010. Surface properties of *Saccharomyces cerevisiae* lees during sparkling wine ageing and their effect on flocculation. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.009>.
- Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., Fancello, F., Zara, S., 2020. Yeast biofilm in food realms: occurrence and control. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 36, 134. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02911-5>.
- Zhang, D., Wang, F., Yu, Y., Ding, S., Chen, T., Sun, W., Liang, C., Yu, B., Ying, H., Liu, D., Chen, Y., 2021. Effect of quorum-sensing molecule 2-phenylethanol and ARO genes on *Saccharomyces cerevisiae* biofilm. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 3635–3648. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11280-4>.

Partie 2. Du phénotype au déterminant génétique : étude préliminaire

1. Contexte

Dans la partie 1, nous avons montré une grande diversité phénotypique dans les propriétés de surface des cellules de *Brettanomyces bruxellensis* et de bioadhésion en lien direct avec le groupe génétique. Concernant la bioadhésion, la totalité des souches analysées présente une capacité à bioadhérer sur acier inoxydable, qui est significativement plus élevée pour le groupe génétique Beer. La formation de cellules pseudohyphales a également été mise en évidence dans nos conditions expérimentales notamment pour le groupe génétique « Teq/EtOH ».

Le fait que des différences de phénotypes soient observables selon le groupe génétique nous laisse penser que des déterminants génétiques pourraient être à l'origine de la variabilité observée. Chez d'autres levures œnologiques comme *Saccharomyces cerevisiae*, la famille des gènes *FLO* et en particulier le gène *FLO11* ont été identifiés comme jouant un rôle dans les phénomènes de bioadhésion et de formation de cellules pseudohyphales (Zara et al., 2005). Chez *B. bruxellensis*, ces déterminants génétiques n'ont pour l'heure pas encore été identifiés. Récemment, le séquençage des génomes de *B. bruxellensis* réalisé par l'équipe du Professeur Joseph Schacherer du laboratoire de Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie de Strasbourg ouvre la voie vers l'étude des mécanismes moléculaires sous-jacents expliquant ces phénotypes et leur variation selon le groupe génétique. Il a ainsi été possible de confirmer les différents groupes génétiques précédemment identifiés selon le niveau de ploïdie et la matrice d'origine (Gounot et al., 2020 ; Eberlein et al. 2021). La description des gènes candidats chez des espèces proches présentant des propriétés de bioadhésion et de formation de cellules pseudohyphales et la disponibilité de la séquence des génomes rendrait possible la recherche de ces déterminants génétiques chez *B. bruxellensis*. Dans ce contexte, un travail de phénotypage à plus grande échelle a été mis en place pour compléter les observations faites sur les 54 souches précédemment phénotypées et constituer, sur un nombre d'individus significatifs, une base de données compatible avec l'analyse statistique. Seules les capacités de bioadhésion, étape clé dans la formation de biofilms et le pourcentage de formation de cellules pseudohyphales en état de bioadhésion ou planctoniques ont été considérées pour ce travail de phénotypage afin de faciliter de mise en œuvre expérimentale et la collecte des données.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Souches et culture cellulaire

Dans le cadre de cette étude, 130 souches de *B. bruxellensis* représentatives de la diversité génétique de l'espèce et dont le génome a été séquencé ont été rajoutées en complément des 40 souches phénotypées au chapitre 2 (14 souches ont été exclues de l'analyse du fait de l'absence de données de séquençage de leur génome). Ainsi, 170 souches au total sont considérées. (Annexe 1). Ces souches sont conservées à -80 °C dans un mélange de YPG 70 % comprenant 2 % (p/v) de glucose (Fisher Bio-Reagent™), 1 % (p/v) d'extrait de levure (Fisher BioReagent™), 1 % (p/v) de peptone (Gibco) et 30 % de glycérol (v/v) avant d'être cultivées sur un milieu solide YPG (gélose Fisher BioReagent™ à 2 % (p/v)) puis incubées pendant 5 jours à 25 °C.

Le milieu Wine Like Medium (WLM) est utilisé pour le phénotypage (Chapitre 2). Des étapes de préculture nécessaires afin d'adapter les levures au milieu WLM sont mises en œuvre telles que décrites dans le chapitre 2. A partir du milieu solide YPG, la biomasse est récupérée puis transférée dans 10 mL d'un mélange composé de 25 % (v/v) de milieu WLM et de 75 % (v/v) de milieu YPG liquide (2 % (p/v) de glucose, 1 % (p/v) d'extrait de levure et 1 % (p/v) de peptone) pour 48 h d'incubation à 25 °C sous agitation à 180 rpm. Cette étape d'adaptation est répétée 3 fois et la proportion de WLM est progressivement augmentée (50 %, 75 % et enfin 90 %). Après 48 h d'incubation (25 °C, 180 rpm), la culture cellulaire est prélevée pour l'analyse des propriétés de bioadhésion et de la croissance pseudohyphale.

2.2. Croissance pseudohyphale (cellules planctoniques)

La culture cellulaire est filtrée sur un filtre de 0,4 µm (Isopore™). Le filtre est ensuite placé sur un tampon contenant un mélange tampon ChemSol B16 (Chemunex) supplémenté à 1 % (v/v) de fluorochrome V6 (Chemunex), puis incubé 30 min dans l'obscurité à 30 °C. La proportion de pseudohyphes est évaluée par microscopie à épifluorescence (10 champs de vision).

2.3. Bioadhésion (formes cellulaires classiques et pseudohyphales)

Concernant le protocole de bioadhésion, la culture cellulaire obtenue après 48h de croissance dans du WLM 90 % est centrifugée pendant 5 min à 7000g à température ambiante puis le culot cellulaire est lavé deux fois avec de l'eau physiologique (NaCl 0,9 %). Le culot est ensuite remis en suspension dans 20 mL d'un mélange WLM 90 % et YPG 10 % et ajusté pour obtenir une concentration finale de 10^7 cellules/mL. La bioadhésion est réalisée sur des coupons d'acier

inoxydable 316L de dimension 14 mm × 25 mm (Goodfellow), Les coupons sont nettoyés conformément à la procédure décrite dans le chapitre 2. Les coupons rincés sont placés dans des boîtes de Petri d'un diamètre de 55 mm et 10 mL de suspension cellulaire sont ensuite ajoutés aux boîtes de Petri pour initier la bioadhésion pendant 3 h à température ambiante.

La quantification des cellules bioadhérées et des cellules pseudohyphales bioadhérées est réalisée par microscopie confocale. Après 3 h de bioadhésion, une étape de lavage du coupon est effectuée afin d'éliminer les cellules non adhérentes qui ont sédimenté. Cette étape consiste en 5 bains de nettoyage successifs dans un récipient stérile contenant de l'eau physiologique. Le coupon est ensuite placé dans une solution de Chemsol B15 (Biomérieux) contenant 1 % (v/v) de 5(6)-carboxyfluorescéine diacétate (CFDA) (Thermo Fisher Scientific) à 8 mg/mL et 0,2 % (v/v) d'iodure de propidium (IP) à 1 mg/mL (Thermo Fisher Scientific) avec un temps de coloration de 15 min. La surface du coupon est observée par microscopie confocale au sein de la plateforme Bordeaux Imaging Center Bordeaux du pôle végétal INRAE. Les observations sont réalisées à l'aide d'un objectif à immersion et les acquisitions confocales à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser Zeiss LSM 880 avec un objectif de plongée de x40 et une ouverture numérique de 1. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement de 488 nm/499–553 nm et de 561 nm/588–688 nm pour le CFDA et l'iodure de propidium. Les fluorochromes sont détectés séquentiellement. La concentration en cellules bioadhérées est déterminée par un calcul de la moyenne de 10 champs d'observation.

3. Résultats et discussion

3.1. Cellules pseudohyphales planctoniques

L'étude de la formation de cellules pseudohyphales en condition planctonique a été conduite par microscopie à épifluorescence après 48 h d'incubation à 25 °C sous agitation à 180 rpm pour les 130 souches supplémentaires. L'ensemble des 170 phénotypes (y compris les phénotypes des 40 souches obtenus chapitre 2) est considéré pour l'analyse statistique. Il a ainsi été observé que 56 % des souches présentent la capacité à former des cellules pseudohyphales planctoniques (Fig. 18). Ce résultat est en accord avec celui obtenu lors du phénotypage des 54 souches où 65 % des souches exprimaient ce phénotype. La proportion en cellules pseudohyphales par souche est comprise entre 0 % et 10 % pour une grande majorité des souches étudiées (145/170) dont 75 souches où cette proportion est de 0 %. Une proportion comprise entre 10 % et 20 % de cellules pseudohyphales est décrite pour 16 souches. Enfin, de

façon remarquable, une souche présente une proportion de cellules pseudohyphales planctoniques de 97 % (YJS7839, Teq/EtOH).

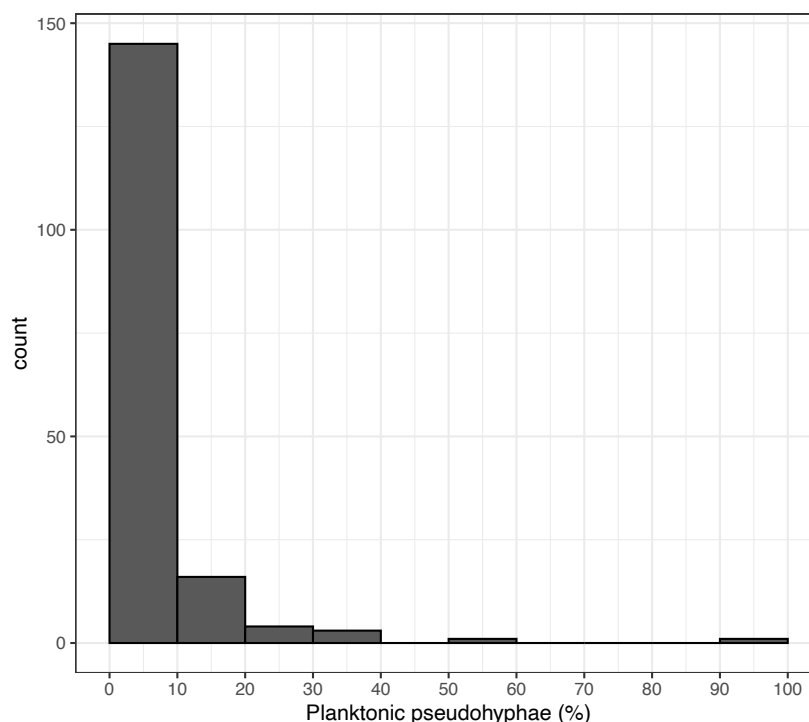


Figure 18 : Répartition totale de nombre de souches en fonction de la proportion de cellules pseudohyphales planctoniques (n=170)

Des différences significatives selon les groupes génétiques sont mises en évidence (Kruskal-Wallis, p-value = 0,005) (Fig. 19). En effet, le groupe Teq/EtOH avec le groupe Beer présentent les proportions en cellules pseudohyphales planctoniques les plus élevées avec en moyennes 15,42% et 5,08% respectivement (p-value > 0,005). Lors du phénotypage des 54 souches, le groupe Kombucha présentait une proportion en cellules pseudohyphales similaire l'étude actuelle (16,08 % contre 15,42 %). Par ailleurs, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes génétiques Beer, Kombucha, Wine 1 et Wine 2 ainsi qu'entre les groupes génétiques Kombucha, Wine 1, Wine 2 et Wine 3 (p-value > 0,005). Le groupe Wine 3 présente la proportion en cellules pseudohyphales planctoniques la plus faible avec en moyenne 2,23 %. Au regard de la proportion de souches par groupe génétique formant des cellules pseudohyphales, 85 % des souches du groupe Teq/EtOH sont productrices contre seulement 40 % pour le groupe Wine 3.

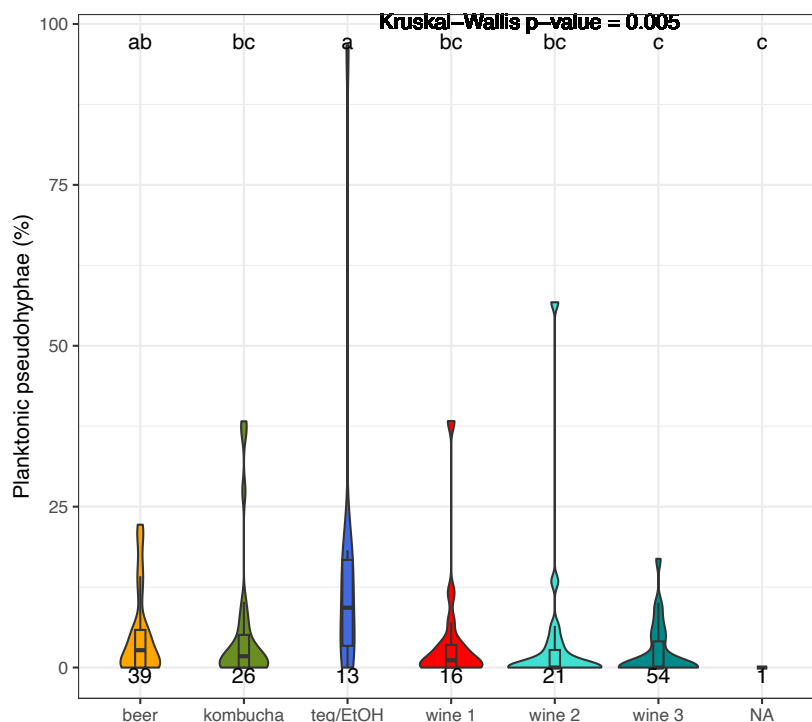


Figure 19 : Proportion de cellules pseudohyphales en fonction du groupe génétique (n=170). Les lettres représentant les différents groupes de significativité définis par un test Kruskal-Wallis (Agricolae package, R, p-value < 0,005).

3.2. Cellules pseudohyphales bioadhérées

Les observations de cellules pseudohyphales bioadhérées ont été réalisées par microscopie confocale uniquement sur les 130 nouvelles souches de *B. bruxellensis* (et non pas sur 170 souches par manque de disponibilités de la plateforme) après 3h de bioadhésion à température ambiante. 44,6 % des souches testées (n=58) n'ont pas présenté de cellules pseudohyphales et ont donc un niveau inférieur à la limite de détection de $2,21 \times 10^2$ cell/cm² représentée par une ligne pointillée rouge sur la figure 20. 45 % des souches testées (n= 59) présentent un nombre de cellules pseudohyphales bioadhérées compris entre 10^3 et 10^5 cell/cm². De plus, 2 souches appartenant respectivement aux groupes Teq/EtOH (YJS7839) et Beer (YJS8162) bioadhèrent avec un nombre de cellules supérieur à 10^5 cell/cm², soit $2,69 \times 10^5$ cell/cm² et $2,41 \times 10^5$ cell/cm².

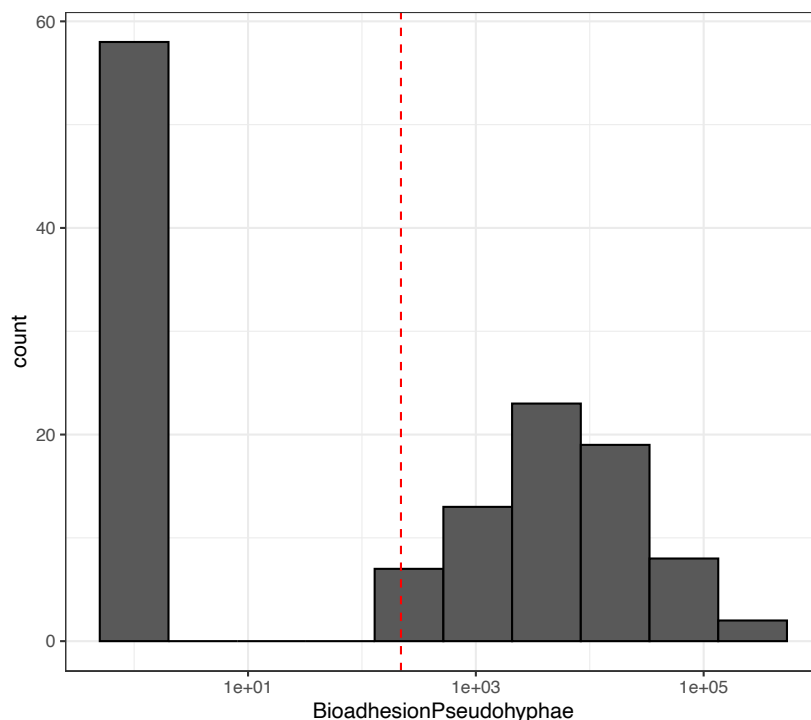


Figure 20 : Répartition totale des souches en fonction de la concentration en cellules pseudohyphales bioadhérées (n=130). La ligne en pointillé rouge représente la limite de détection

Concernant la bioadhésion des cellules pseudohyphales, aucune différence significative n'est observée entre les groupes génétiques (p -value > 0,05) (Fig. 21). Les groupes Beer et Teq/EtOH présentent les proportions les plus importantes de cellules pseudohyphales bioadhérées, avec respectivement 87 % et 80 % des cellules bioadhérées qui forment des pseudohyphes. Le groupe Wine 1 présente la proportion la plus faible avec 36 %.

Ainsi, nos résultats montrent que pour 55 % des souches (sur les 130 étudiées), il est possible d'observer des cellules pseudohyphales bioadhérées. Cependant, aucune différence significative n'est observée entre les groupes génétiques traduisant un effet souche dans l'expression de ce phénotype. La présence de cellules pseudohyphales est rapportée lors de la formation de biofilm chez les levures et plus particulièrement chez *C. albicans* où ces formes cellulaires sont associées à la structuration et au maintien du biofilm (Kumari et al., 2018). Cette observation a également été réalisée par Lebleux et al (2020) où la présence de pseudohyphes a été observée au sein de biofilms de *B. bruxellensis*.

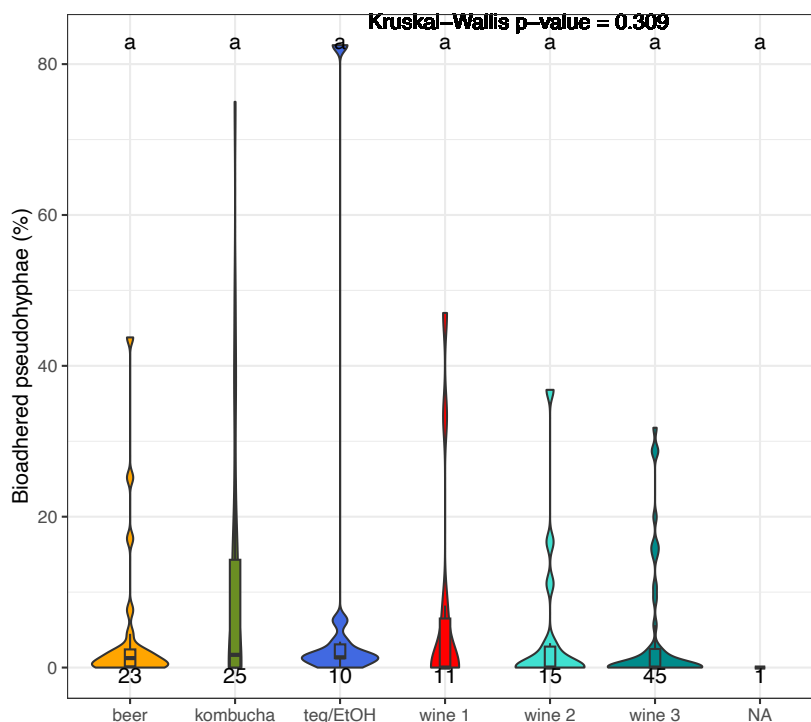


Figure 21 : Proportion de cellules pseudohyphales bioadhérées en fonction du groupe génétique (n=130). Les lettres représentant les différents groupes de significativité définis par un test Kruskal-Wallis (Agricolae package, R, p-value < 0,05)

3.3. Bioadhésion des cellules classiques

L'étude de la bioadhésion des cellules classiques a été conduite sur acier inoxydable 316L après 3h à température ambiante sur les 130 nouvelles souches. L'ensemble des 170 phénotypes (comportant les phénotypes des 40 souches obtenus en partie 1) est considéré pour l'analyse statistique (Fig. 22). Toutes les souches présentent des capacités de bioadhésion mais avec une variation importante dans le nombre de cellules adhérentes allant de $2,21 \times 10^2$ cell/cm² à $4,16 \times 10^6$ cell/cm² selon la souche. Les groupes Beer et Teq/EtOH présentent le nombre en cellules bioadhérées le plus élevé avec en moyenne respective $8,5 \times 10^5$ cell/cm² et $3,25 \times 10^5$ cell/cm². Ces résultats confirment ceux de l'étude du phénotypage des 54 souches avec une capacité de bioadhésion avérée pour la totalité des souches et une bioadhésion la plus importante pour les souches du groupe Beer et plus particulièrement Beer 1 comportant les souches isolées du vin. Dans ce chapitre, la distinction en fonction de l'origine des souches du groupe Beer n'a pas pu être effectuée du fait d'un manque d'information pour certaines souches. Les groupes Kombucha, Wine 1, Wine 2 et Wine 3 ne sont pas significativement différents (p-value > 0,05). Par ailleurs la souche présentant l'adhésion la plus faible appartient au groupe Wine 2. Cette

capacité de bioadhésion a également été rapportée dans d'autres études et sur différents support (Joseph et al., 2007 ; Lebleux et al., 2020) mais sur un nombre de souches plus faible.

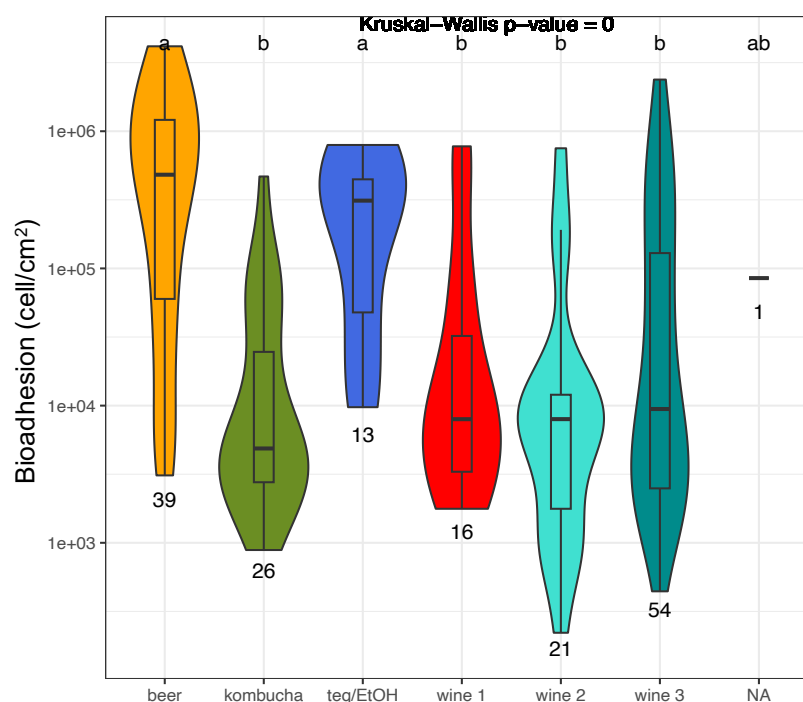


Figure 22 : Capacité de bioadhésion selon le groupe génétique de *B. bruxellensis* (n=170). Les lettres représentant les différents groupes de significativité définis par un test Kruskal-Wallis (Agricolae package, R, p-value < 0,05)

3.4. Analyse intégrative des trois phénotypes

Un *clustering* non hiérarchique par la méthode des *k-means* a été réalisé sur 130 souches afin d'établir leur groupe en fonction de leur comportement phénotypique de bioadhésion, de formation de pseudohyphes en condition planctonique et de formation de pseudohyphes au cours de la bioadhésion (Fig 23A). Un total de 6 clusters a été déterminé sur la base des *screeplot*. Le cluster 1 est composé de 37 souches dont les capacités de bioadhésion, de formation de pseudohyphes planctoniques et bioadhérés sont faibles. Ce cluster est composé à 47% de souches appartenant au groupe génétique Wine 3. Le cluster 2 rassemble 15 souches présentant d'une part, une capacité de bioadhésion et un nombre en cellules pseudohyphales bioadhérées faible et d'autre part, une capacité de formation de cellules pseudohyphales planctoniques élevée ; 30 % des souches de ce cluster appartiennent au groupe Kombucha. Le cluster 3 comprend 19 souches dont seule la capacité de bioadhésion des cellules classiques est élevée ; les souches du groupe Wine 3 sont majoritaires dans ce cluster (52 %). Le cluster 4

comporte 29 souches dont les capacités de bioadhésion et de formation de cellules pseudohyphales planctoniques sont élevées ; la capacité à la formation de cellules pseudohyphales est faible à moyenne. Ce cluster est constitué à 38 % de souches du groupe Beer. Le cluster 5 comporte 14 souches avec une capacité de bioadhésion faible. Cependant, la capacité à la formation de pseudohyphes bioadhérés est élevée ; la formation de pseudohyphes en condition planctonique est faible pour 8 souches et moyenne pour les 6 souches restantes. Les groupes Kombucha et Wine 3 sont présents chacun à 35 %. Enfin, le cluster 6 est composé quant à lui de 15 souches présentant de fortes capacités à la formation de cellules pseudohyphales que ce soit en condition planctonique ou bioadhérée. La capacité de bioadhésion de ce cluster est moyenne et 40 % des souches appartiennent au groupe Kombucha.

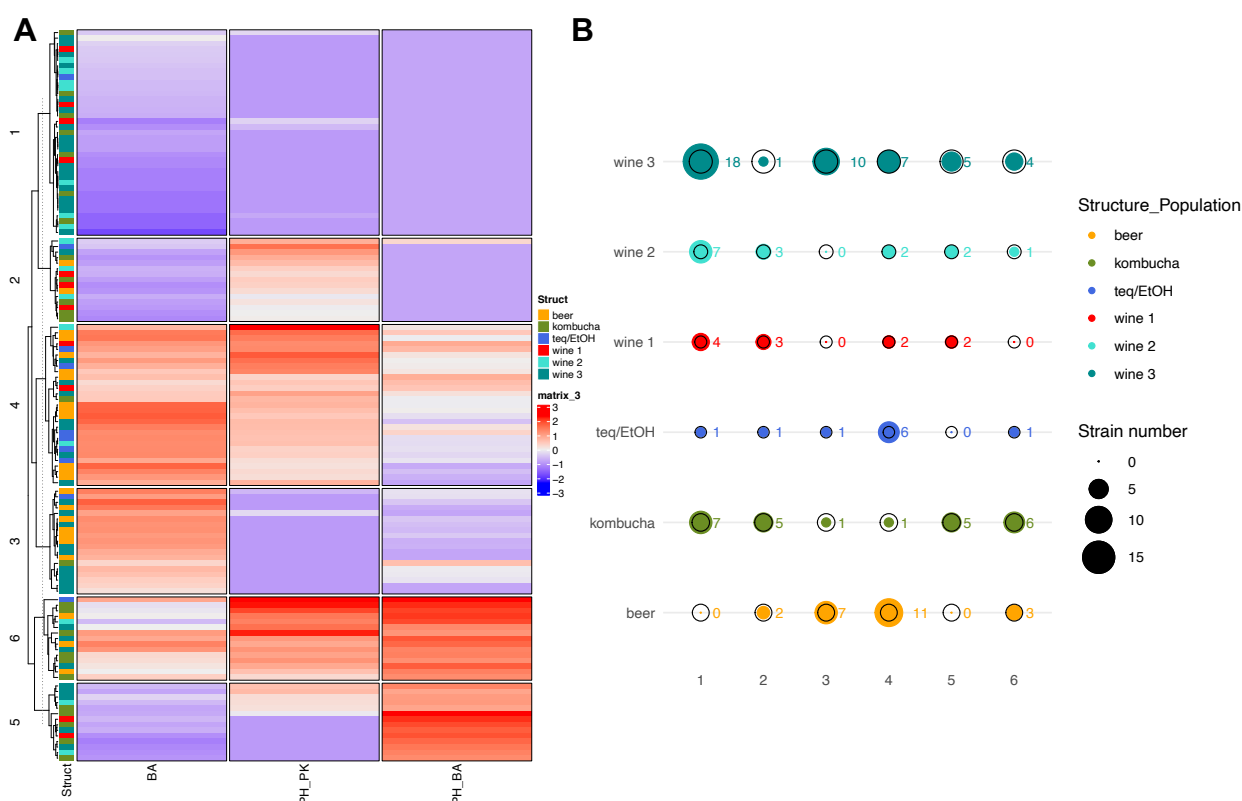


Figure 23 : A. Représentation en heat map des phénotypes de bioadhésion (BA), de formation de cellules pseudohyphales planctoniques (PH_PK) et bioadhérées (PH_BA) sur 130 souches. Les couleurs de gauche correspondant aux différents groupes génétiques. B. Distribution théorique (cercle noir) et réelle (cercle de couleur) des différents groupes génétiques par cluster. Utilisation d'un test χ^2 .

La figure 23B représente la distribution des souches dans les clusters en fonction de leur groupe génétique (cercle de couleur) et leur nombre attendu si la répartition était aléatoire (cercle noir). La répartition observée est significativement différente d'une répartition aléatoire χ^2 (p-value = 0,004). Les groupes Wine 3 et Wine 2 sont sur-représentés dans le cluster 1 et de même que le groupe « Beer » dans les clusters 3 et 4. Le groupe Wine 3 est sous-représentés dans le cluster 2 alors que le groupe Wine 2 est sous-représenté dans le cluster 3. Le groupe Beer est quant à lui sous représenté dans les clusters 1 et 5. Enfin, le groupe Teq/EtOH est sous-représenté dans tous les clusters à l'exception du 4.

L'identification de clusters selon les phénotypes observés révèle que certaines souches en particulier du groupe Wine 3 n'expriment aucun des phénotypes étudiés (cluster 1) alors que d'autres souches expriment fortement soit un ou deux phénotypes indépendamment du groupe génétique (cluster 2, 3 et 5) ; les groupes Beer et Teq/EtOH expriment néanmoins de façon importante les 3 phénotypes (cluster 4). La représentation en « Heat map » révèle pour certains clusters une dichotomie dans l'expression des phénotypes : c'est le cas du cluster 2, où la forme pseudohyphale planctonique est fortement exprimée contrairement à la bioadhésion, du cluster 3 où les souches sont capables de fortement bioadhérer mais pas de former des formes pseudohyphales ou du cluster 5 où inversement, les souches sous forme classique ont une faible capacité de bioadhésion mais forment un nombre important de cellules pseudohyphales principalement sous forme bioadhérées. Ces résultats montrent que les deux modes de vie, bioadhésion ou croissance pseudohyphale sont préférentiellement choisies et de manière exclusive pour certaines souches en réponse au milieu et permettent de poser l'hypothèse de l'existence de mécanismes de régulation différents selon la souche. Aussi, *B. bruxellensis* choisirait l'une ou l'autre des deux stratégies en réponse au milieu, la bioadhésion à la surface des matériaux permettant la survie et la rémanence dans l'environnement ou la croissance pseudohyphale planctonique ou bioadhérée afin de prospecter de nouvelles sources nutritives. Ces données phénotypiques constituent une base de travail pour rechercher les déterminismes génétiques sous-jacents à l'expression de ces phénotypes. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la famille de gènes *FLO* code pour des protéines membranaires interagissant avec le support en établissant des interactions hydrophobes avec celui-ci initiant la bioadhésion (Guo et al., 2000 ; van Mulders et al., 2009). Le gène *FLO11* codant pour une floculine de surface Flo11p est également impliqué dans la différenciation en cellule pseudohyphale (Lo et al., 1997). La famille des gènes *FLO* est également identifiée chez *Komagataella phaffii* où 13 gènes *FLO* ont été identifiés (De et al., 2020). Pour cette espèce, les gènes impliqués dans la croissance pseudohyphale sont *FLO11*, *FLO400* et *FLO5-1* régulés par le répresseur *FLO8*, la

transcription en amont des gènes *FLO400* et *FLO5-1* étant nécessaire pour la transcription de *FLO11*. D'autres déterminants génétiques ont été identifiés dans la régulation de la formation de cellules pseudohyphales chez *S. cerevisiae* comme les P4 ATPases (flippases). La délétion de ces flippases induit une formation aberrante de cellules pseudohyphales impliquant une fonction de régulation dans la croissance pseudohyphale (Frøsig et al., 2020).

L'ensemble de ces gènes décrits chez d'autres espèces constituent des pistes de recherche d'intérêt à transposer chez *B. bruxellensis*.

References

- De, S., Rebnegger, C., Moser, J., Tatto, N., Graf, A.B., Mattanovich, D., Gasser, B., 2020. Pseudohyphal differentiation in *Komagataella phaffii*: Investigating the FLO gene family. *FEMS Yeast Research* 20. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa044>
- Eberlein, C., Saada, O.A., Friedrich, A., Albertin, W., Schacherer, J., 2021. Different trajectories of polyploidization shape the genomic landscape of the *Brettanomyces bruxellensis* yeast species. *Genome Research* 31, 2316–2326. <https://doi.org/10.1101/gr.275380.121>
- Frøsig, M.M., Costa, S.R., Liesche, J., Østerberg, J.T., Hanisch, S., Nintemann, S., Sørensen, H., Palmgren, M., Pomorski, T.G., López-Marqués, R.L., 2020. Pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae* involves protein kinase-regulated lipid flippases. *Journal of Cell Science* 133. <https://doi.org/10.1242/jcs.235994>
- Gounot, J.-S., Neuvéglise, C., Freel, K.C., Devillers, H., Piškur, J., Friedrich, A., Schacherer, J., 2020. High complexity and degree of genetic variation in *Brettanomyces bruxellensis* population. *Genome Biology and Evolution* 12, 795–807. <https://doi.org/10.1093/GBE/EVAA077>
- Guo, B., Styles, C.A., Feng, Q., Fink, G.R., 2000. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12158–12163. <https://doi.org/10.1073/pnas.220420397>
- 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.
- Kumari, A., Mankotia, S., Chaubey, B., Luthra, M., Singh, R. 2018, n.d. Role of biofilm morphology, matrix content and surface hydrophobicity in the biofilm-forming capacity of various *Candida* species. *Journal of Medical Microbiology* 67, 889–892. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000747>

- Lebleux, M., Abdo, H., Coelho, C., Basmaciyan, L., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Roullier-Gall, C., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., Weidmann, S., Rousseaux, S., 2020. New advances on the *Brettanomyces bruxellensis* biofilm mode of life. *International Journal of Food Microbiology* 318. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108464>
- Lo, W.-S., Raitses, E.I., Dranginis, A.M., 1997. Development of pseudohyphae by embedded haploid and diploid yeast. *Curr Genet* 32, 197–202. <https://doi.org/10.1007/s002940050266>
- Van Mulders, S.E., Christianen, E., Sacerens, S.M.G., Daenen, L., Verbelen, P.J., Willaert, R., Verstrepen, K.J., Delvaux, F.R., 2009. Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 9, 178–190. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00462.x>
- Zara, S., Bakalinsky, A.T., Zara, G., Pirino, G., Demontis, M.A., Budroni, M., 2005. FLO11-Based Model for Air-Liquid Interfacial Biofilm Formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2934–2939. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.2934-2939.2005>

Chapitre 3 : Effect of abiotic and biotic factors on *Brettanomyces bruxellensis* bioadhesion properties

Cette troisième partie correspond au deuxième objectif de la thèse visant à étudier l'impact de facteurs biotiques et abiotiques sur les propriétés de surface, la capacité de bioadhésion et de formation de biofilm de *B. bruxellensis*. De nombreuses observations microscopiques ont été réalisées dans cette partie du travail de thèse qui était dépendante de la disponibilité des microscopes confocal et électronique à balayage. Les résultats sont ainsi présentés sous forme d'un article scientifique en préparation qui devrait prochainement être soumis dans Food Microbiology.

Effect of abiotic and biotic factors on *Brettanomyces bruxellensis* bioadhesion properties.

Paul Le Montagner^{1,2,3}, Cecile Miot-Sertier¹, Warren Albertin^{1,4}, Marguerite Dols-Lafargue^{1,4}, Virginie Moine³, Isabelle Masneuf-Pomarède^{1,5}

¹ Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Science Agro, OENO, UMR 1366, ISVV, 33140 Villenave d'Ornon, France

² Laboratoire EXCELL, Floirac, France

³ Biolaffort, Floirac, France

⁴ ENSMAC, Bordeaux INP, 33600, Pessac, France

⁵ Bordeaux Sciences Agro, 33175, Gradignan, France

Abstract

Biofilms are central to microbial life due to the benefits conferred on these communities secreting an extracellular matrix. During the wine making process, grape must and wines host a great diversity of microorganisms. This is the case of *Brettanomyces bruxellensis* considered to be the most damaging spoilage yeast due to its negative sensory effect on wine and its ability to colonize stressful environments. The ability to develop into a biofilm depends on the species and strain considered but also on environmental conditions. In this study, the effect of biotic and abiotic factors on bioadhesion and biofilm formation capacities was analyzed in *Brettanomyces bruxellensis*. The effect of pH and ethanol concentration are negligible on surface properties, pseudohyphae cell formation and bioadhesion but strain and genetic group effects are predominant in explaining the phenotypes studied. The presence of two strains of *B. bruxellensis* does not produce a synergistic effect in the formation of the biofilm but competition is established between the strains. Finally, the presence of wine bacteria seems to limit the bioadhesion of *B. bruxellensis*. However, interactions between *O. oeni* and *B. bruxellensis* have been observed due to biofilm formation.

1. Introduction

A large majority of microorganisms on Earth have been identified as preferentially found on the surface of a support rather than as free planktonic cells in the environment (Costerton et al., 1995; Kolter and Greenberg., 2006). These communities called biofilms are characterized by the structuring of the microorganisms that compose them but also by the production of extracellular matrix (Costerton et al., 1999). These biofilms are found in various environments, and it is estimated that more than 80% of terrestrial microbial biomass is present on biofilm form thus playing a crucial role in the proper functioning of most anthropized or not environments (Richards and Melander., 2009; Flemming and Wuertz., 2019; Bridier and Briandet., 2022). In addition, the presence of biofilm can also be problematic in certain fields such as medical, agri-food and maritime transport given their resistances and pathogenicity's (Hall-Stoodley et al., 2004; Piola et al., 2009; Zara et al., 2020). This resistance is mainly due to the presence of an extracellular matrix composed of polysaccharides, proteins, peptidoglycans, nucleic acids, lipids serving as a barrier against external aggressions (Czaczyk and Myszka., 2007; Flemming et al., 2007). However, biofilm formation is dependent on several environmental factors such as pH, temperature, carbon source concentration (Fathollahi and Coupe., 2021; Liu et al., 2023). The presence of microorganisms genetically related to or belonging to other species can also have a major effect on biofilm formation. It is shown that the presence of several strains of *Escherichia coli* in the same environment induces a synergistic effect promoting the formation of biofilm (Reisner et al., 2006). On the contrary, in *Listeria monocytogenes*, biofilm formation is inhibited in the presence of *Lactiplantibacillus paraplantarum* (Winkelströter et al., 2015).

In oenology, and more particularly during the winemaking process, it is possible to meet many microorganisms participating to the fermentations and in the aromatic panel of wine by the production of molecules of interest or wine defects (Gammacurta et al., 2017; Tempere et al., 2018; Carpena et al., 2021). Among the microorganisms producing off-flavors, *Brettanomyces bruxellensis* is the major spoilage yeast because of the production of volatile phenols characterized by stable odors, horse sweat and leather masking the fruity aromas of wines (Chatonnet et al., 1992; Lattey et al., 2010). *B. bruxellensis* is identified throughout the winemaking process thanks to adaptation mechanisms allowing it to grow in stressful environments (Renouf and Lonvaud-Funel., 2007; Rubio et al., 2015). This species is characterized by a high genetic diversity directly related to ploidy and the original niche of isolation of the strain (Albertin et al., 2014; Avramova et al., 2018). Thus, 2 diploid groups and

4 triploid groups have been identified (Harrouard et al., 2022). Tolerance and resistance to sulphites (SO₂), the main antimicrobial used in oenology, has been identified to be link with the genetic group (Curtin et al., 2012; Avramova et al., 2018b). This tolerance may come from the increase in the use of SO₂ since the 1980s, thus inducing selection pressure on strains (Curtin et al., 2012; Cibrario et al., 2019). In addition to being present throughout the winemaking process, it has been shown that strains of *B. bruxellensis* can be found from year to year within the same winery, thus showing a persistence of the species in this winemaking environment (Cibrario et al., 2019). *B. bruxellensis* has thus been identified in the air, on floors, walls, winemaking vats, winemaking equipment and barrels (Fugelsang et al., 1997; Connell et al., 2002; Chapter 2). This persistence can be explained by the fact that *B. bruxellensis* has strong bioadhesion and biofilm formation capacities (Joseph et al., 2007; Dimopoulou et al., 2019; Lebleux et al. 2020). In addition, differences in bioadhesion are observable depending on the genetic group, the strains of the Beer group presenting the most expressed phenotype (Chapter 2). Other microorganisms such as *Oenococcus oeni* are known to be able to form biofilms in wine, thus promoting a better efficiency of malolactic fermentation (Bastard et al., 2016). However, the effect of biotic and abiotic factors on biofilm formation in *B. bruxellensis* has been so far poorly studied. Therefore, the first objective of this study is to evaluate the effect of two abiotic factors (pH and ethanol concentration) on the surface properties and bioadhesion of *B. bruxellensis*. The second objective is to study the formation of mixed-strain and mixed-species biofilms.

2. Materials and methods

2.1. Abiotic factors

2.1.1. Strains and growth conditions

In order to study the effect of abiotic factors on the surface and bioadhesion properties of *B. bruxellensis*, a total of 17 strains presenting surface and bioadhesion phenotypes were selected for this study (Chapter 2) (Table 3). These strains were isolated from different substrates and are part of the CRBO collection (Microbiological Resources Center Oenology, Bordeaux, France), the AWRI collection (Australian Wine Research Institute, Adelaide, Australia), the CBS collection (Fungal Biodiversity Center, Utrecht, Netherlands), the GSP collection (Foggia University, Foggia, Italia) and the YJS collection (Laboratory for Molecular Genetics, Genomics and Microbiology, Strasbourg, France). The strains were stored at -80 °C in a mixture of YPD 70 % (v/v) comprising 2 % (w/v) glucose (Fisher BioReagent™), 1 % (w/v) peptone

(Gibco), 1 % (w/v) yeast extract (Fisher BioReagent™) and glycerol 30 % (v/v) before being cultured on a YPD solid medium (2 % (w/v) agar (Fisher BioReagent™)) and incubated for 5 days at 25 °C.

Table 3: List of the 17 strains of *Brettanomyces bruxellensis* used in this study and originated from the Microbiological Resources Center Oenology (CRBO collection), the Australian Wine Research Institute collection (AWRI collection), the Fungal Biodiversity Center collection (CBS-KNAW collection), Foggia University collection (GSP collection) and from the Laboratory for Molecular Genetics, Genomics and Microbiology collection (YJS collection) (*Avramova et al., 2018)

Strain	Genetic groups*	Ploidy*	Substrate
GSP 1502			Beer
AWRI 1608			Red wine
YJS5400	Beer	3n	White wine
CRBO L17118			Beer
CRBO L17119			Red wine
AWRI 1499			Red wine
CRBO L14156	Wine 1	3n	Wine
CRBO L14175			Wine
CRBO L0308			Red wine
CRBO L1782	Wine 2	3n	Wine
CBS 2499			Red wine
CRBO L0611	Wine 3	2n	Red wine
CRBO L1715			Red wine
CRBO L17102			Ethanol
CRBO L17109	Teq/EtOH	3n	Tequila
CRBO L1757			Na
CRBO L17103	Kombucha	2n	Kombucha

2.1.2. Growth and adaptation protocol to abiotic factors

All analysis of the section 2.1 were realized in Wine Like Medium (WLM) which was used due to its close composition to wine. WLM is composed of 0.05 % (w/v) glucose (Fisher Bio-Reagent™), 0.15 % (w/v) fructose (Sigma Aldrich®), 0.2 % (w/v) tartaric acid (Prolabo), 0.05 % (w/v) citric acid (Prolabo), 0.03 % (w/v) malic acid (Aldrich Chemistry), 0.25 % (w/v) yeast extract (Fisher Bio- Reagent™), 0.5 % (w/v) glycerol (Sigma Aldrich®). The effect of two abiotic factors, pH and alcohol concentration, was studied. For the pH effect, 3 values were

considered for WLM: 3.6, 3.8 and 4.1. The pH value was adjusted with KOH 5M. For the alcohol concentration effect, 3 levels of ethanol concentration were considered for WLM, 5 %, 10 % and 14 % (v/v) (VWR Chemicals®). In order to optimize this protocol, an experimental design was implemented (Table 4). Adaptation steps were necessary for the yeast growth in the WLM medium. Briefly, few colonies were recovered from solid medium and transferred into 10 mL of a mixture consisting of 25 % (v/v) of WLM medium and 75 % (v/v) of liquid YPD medium (2 % (w/v) of glucose, 1 % (w/v) of yeast extract and 1 % (w/v) of peptone for 48 h of incubation at 25 °C under stirring at 180 rpm. This adaptation step was repeated 3 times and the proportion of WLM was gradually increased (50 %, 75 % and finally 90 %). After 48 h of incubation (25 °C, 180 rpm), the cell suspension was collected to perform the surface charge and cell hydrophobicity analysis, pseudohyphae growth and bioadhesion.

2.1.3. Cell surface charge

The measurement of the cell surface charge was carried out by centrifuging the cell culture at 7000 g for 5 min at room temperature and then the cell pellet was washed twice in ultra-pure water with pH value according to experimental design. Cell pellet was then resuspended in ultra-pure water at pH value according to experimental design filtered on nylon filter (0.45 µm) to obtain a cell suspension with a OD_{600nm} around 0.7. The measurement of the zeta potential was carried out via the Zetasizer Nano (Malvern). For each strain, three measurements were made on the same cell culture.

Table 4: Experimental design applied in the experimentation on pH and ethanol effects on *B. bruxellensis* cell surface and bioadhesion properties

Series	pH value	Ethanol
		concentration (% v/v)
1	4.1	5
2	3.6	14
3	3.6	10
4	3.8	5
5	4.1	10
6	3.8	10
7	4.1	14
8	3.8	14
9	3.6	5

2.1.4. Cell surface hydrophobicity

The measurement of the cell hydrophobicity was carried out by the MATS (Microbial Adhesion To Solvents) technique which makes it possible to determine the hydrophilic/hydrophobic property of the yeast surface (Bellon-Fontaine et al., 1996). Ten milliliters of cell suspension were centrifuged for 5 min at 7000 g at room temperature then the pellet was washed twice with distilled water and were resuspended in physiological water (NaCl 0.9 %) to obtain a cell suspension with an OD_{600nm} around 0.7. 1.5 mL of cell suspension were mixed with 250 μ L of two solvents, chloroform (Fisher Chemical) or hexadecane (Sigma-Aldrich). The mixture was vortexed for 2 min to create an emulsion. Then a rest period of 15 min allowed the separation of the 2 phases. The optical density of the cell suspension (OD0) and the aqueous phase of the mixture (DO) were measured at 600 nm. The affinity for each solvent was calculated using the formula shown in chapter 2.

2.1.5. Pseudohyphae growth

To evaluate the proportion of pseudohyphae, 1 mL of cell suspension was sampled. The sample was filtered on 0.4 μ m filter (Isopore™). The filter was then placed on a pad containing a mixture of ChemSol B16 (Chemunex) buffer containing 1 % (v/v) of fluorochrom V6 (Chemunex), and the pad was incubated 15 min in the dark at 30 °C. The proportion of pseudohyphae was evaluated by epifluorescence microscopy (10 fields of vision counts).

2.1.6. Bioadhesion properties

To perform the bioadhesion, the cell suspension was centrifuged for 5 min at 7000 g at room temperature and then the cell pellet was washed twice with physiological water (NaCl 0.9 %). The pellet was then resuspended in 20 mL of a mixture WLM 90 % and YPD 10 % and adjusted to obtain a final concentration of 10^7 cells/mL. The bioadhesion was made on 316L stainless steel coupons of dimension 14 mm x 25 mm (Goodfellow) after cleaning procedure explained in Chapter 2 (section 2.4.1). The rinsed coupons were placed in Petri dishes with a diameter of 55 mm, 10 mL of cell suspension was then added to the Petri dishes to initiate bioadhesion for 3h at room temperature. The quantification of bioadhesion was performed by confocal microscopy. After the 3h, a coupon washing step was performed to remove the non-adherent cells that had sedimented. This step consists of 5 successive cleaning baths in a sterile container containing physiological water. The coupon was then placed in a solution of Chemsol B15 (Biomerieux) containing 1 % (v/v) of 5(6)-Carboxyfluorescein Diacetate (CFDA) (Thermo Fisher Scientific) at 8 mg/mL for the detection of live cells and 0.2 % (v/v) propidium iodide

(PI) at 1 mg/mL for the detection of dead cells (Thermo Fisher Scientific) with a standby time of 15 min. The surface of the coupon was observed by confocal microscopy within the Bordeaux Imaging Center Bordeaux facilities of the INRAE plant pole. Observations were made using the immersion lens. Confocal acquisitions were realized using a Zeiss LSM 880 confocal laser-scanning microscope with a diving 40× objective with a numerical aperture of 1. The excitation wavelengths and emission windows were respectively 488 nm/499–553 nm and 561 nm/588–688 nm for CFDA and propidium iodide. Fluorochromes were detected sequentially line by line. The adhered dead and live cells were counted by the mean of 10 fields of vision counts.

2.2. Multi-strains biofilm

2.2.1. Strains and growth adaptation

In this part, 4 strains of *B. bruxellensis* were selected for their bioadhesion properties described in Chapter 2 (Table 5). The growth conditions applied were the same as those described in section 2.1.1. Adaptation steps are necessary for the yeast growth in the WLM medium. Here, the composition of the WLM medium was the same as those described in section 2.1.2 with a pH value of 3.6 adjusted with KOH and the ethanol concentration of 10 % (v/v) (VWR Chemical®). Few colonies were recovered from solid medium and transferred into 10 mL of a mixture consisting of 25 % (v/v) of WLM medium and 75 % (v/v) of liquid YPD medium (2 % (w/v) of glucose, 1 % (w/v) of yeast extract and 1 % (w/v) of peptone for 48 h of incubation at 25 °C under stirring at 180 rpm. This adaptation step was repeated 3 times and the proportion of WLM was gradually increased (50 %, 75 % and finally 90 %). After 48 h of incubation (25 °C, 180 rpm), the cell culture was collected to perform multi-strains bioadhesion competition.

Table 5: List of the 4 strains used in the mix composition according to their genetic groups (*Avramova et al., 2018) and bioadhesion properties (**Chapter 2)

Strain	Genetic group*	Bioadhesion properties**
AWRI 1499	Wine 1	Weak
AWRI 1608	Beer	High
CBS 2499	Wine 3	High
CRBO L17109	Teq/EtOH	Pseudohyphae bioadhered

2.2.2. Bioadhesion and biofilm

To perform the multi-strain bioadhesion, the cell culture was centrifuged for 5 min at 7000 g at room temperature and then the cell pellet was washed twice with physiological water (NaCl 0.9 %). The pellet was then resuspended in 20 mL of a mixture WLM 90 % and YPD 10 %. 4 mixes were carried out: AWRI1499/AWRI1608 (MX1), AWRI1608/CRBOL17109 (MX2), AWRI1499/CRBOL17109 (MX3) and AWRI1608/CBS2499 (MX4). For each mix, the final concentration was 2.0×10^6 cell/mL (1:1). As a positive control, the bioadhesion was also carried out for the culture of each strain. For the bioadhesion, 10 mL of mix and single culture strain were then added to the Petri dishes containing a coupon of 316L stainless steel previously cleaned. The bioadhesion was carried out for 3h at room temperature. Then a coupon washing step was performed to remove non-adherent cells on the surface of the coupon. This step consists of 5 successive cleaning baths in a sterile container with physiological water. Once rinsed, the coupons were placed in a 30 mL vial and 30 mL of WLM medium were added. The vials are then placed at 20 °C until analysis. For each measurement point at 3 h, 7 and 14 days, the samples were prepared in triplicate.

2.2.3. Enumeration of bioadhered cells by cultivation

The enumeration of viable cells was carried out after the 3h, 7 and 14 days. The coupon was cleaned from the non-adhered cells by 5 successive washes in sterile physiological water (NaCl 0.9%). The coupon was then placed in a 50 mL tube containing 10 mL of sterile physiological water (NaCl 0.9%) and then the whole suspension was placed 2 min in sonication at 47 Hz. After this sonication step, the tube was stirred at maximum speed for 40 s. Dilutions series were then carried out and 100 μ L of the suspension were inoculated in triplicate on YPD agar medium. The result is then expressed as Colony Forming Unit per cm^2 (CFU/ cm^2).

2.2.4. Biofilm thickness

The measurement of the thickness of bioadhesion and biofilm was carried out on MX1, MX2 and MX3 by observations in confocal microscopy (For MX4, it was not possible to perform confocal analysis because the Bordeaux Imaging Center Bordeaux facilities was not available). After the rinsing steps described in part 2.6.2, the coupon was then placed in a solution of Chemsol B15 (Biomerieux) containing 1 % (v/v) of 5(6)-carboxyfluoresceine diacetate (CFDA) (Thermo Fisher Scientific) at 8 mg/mL and 0.2 % (v/v) propidium iodide (PI) at 1 mg/mL (Thermo Fisher Scientific) during 15 min. The surface of the coupon was observed by confocal microscopy within the Bordeaux Imaging Center facilities of the INRAE plant service.

Observations were made using the immersion lens as described in 2.1.6. The thickness measurement was carried out by taking successive images of each focal plane with the z-stack function of the ZEN microscopy software (Zeiss). The thickness analysis was then performed on 10 biofilms areas using the ROI manager function present on the FIJI image processing software extension of the ImageJ software.

2.2.5. Genetic identification

In order to determine the proportion of each strain per mix, 15 yeast colonies were collected at random in each Petri dish enumerated in the section 2.2.3 (90 colonies per mix). The colonies were placed in 20 μ L of NaOH 20mM for DNA extraction. This mixture was incubated 10 min at 90 °C and then placed at -20 °C during 30 min. These steps were repeated 3 times. The genetic group of each colony was determined by a molecular analysis tool based on the microsatellite analysis by PCR (Typ\Brett, patent number WO2017068284, 10/2016). The results were expressed by percentage of each strain/genetic group per mix.

2.3. Pluri-species biofilm

2.3.1. Strains and growth adaptation

For the pluri-species experimentation, one strain of *B. bruxellensis* (AWRI1608) from AWRI collection and belonging to the Beer group was selected for its high bioadhesion properties. For the Lactic Acid Bacteria (LAB), one industrial strain of *Oenococcus oeni* (Lactoenos® B7) and for Acetic Acid Bacteria (AAB), a strain of *Acetobacter pasteurianus* isolated from red wine were used in this study. The *B. bruxellensis* and AAB strains were incubated for 5 days at 25 °C. The experimentation was conducted in red wine, for *B. bruxellensis* and *A. pasteurianus* adaptation steps were necessary. Few colonies were recovered from solid medium and transferred into 10 mL of a mixture consisting of 25 % (v/v) of red wine (Graves, 12% vol, pH 3.7) and 75% (v/v) of grape juice, and incubated for 48 h (25 °C, 180 rpm). This adaptation step was repeated 3 times and the proportion of red wine was gradually increased (50 %, 75 % and finally 90 %). The industrial freeze-dried LAB were stored at -20 °C before utilization. LAB was inoculated at 10⁸ cells/mL at 25 °C in a mixture composed of 90 % of red wine (v/v) and 10 % of grape juice (v/v) 48h before bioadhesion.

2.3.2. Bioadhesion and biofilm

To perform the pluri-species bioadhesion, 3 conditions were tested, bioadhesion Brett/LAB, bioadhesion Brett/AAB and bioadhesion Brett/LAB/AAB and bioadhesion monospecies controls. The cell cultures were centrifuged for 5 min at 9000 g for bacteria and 7000 g for *B. bruxellensis* at room temperature and then the cell pellet was washed twice with physiological water (NaCl 0.09%). The pellets were resuspended in 20 mL of a mixture of red wine 90 % (v/v) and grape juice 10% (v/v) adjusted to 5.0×10^6 cell/mL for *B. bruxellensis* and 10^6 cell/mL for bacteria. In the case of Brett/LAB/AAB the concentration of bacteria was 1.0×10^6 with a ratio of 1:1 for LAB and AAB. Bioadhesion was carried out sequentially. The bacteria were first brought into contact with the previously cleaned stainless steel (Chapter 2 section 2.4.1) for 48 hours. After 48h of bioadhesion, a coupon washing step was performed to remove non-adherent bacteria cells on the surface of the coupon. This step consists of 5 successive cleaning baths in a sterile container containing physiological water. Once rinsed, the coupons were placed in Petri dishes and *B. bruxellensis* suspension was added for bioadhesion during 3h at room temperature. After these 3 h, another coupon washing step was performed to remove non-adherent yeast on the surface of the coupon. Once rinsed, the coupons were placed in a 30 mL vial and 30 mL a mixture of 90 % (v/v) of red wine and 10 % (v/v) of grape juice were added. The vials are then placed at 20 °C until analysis at 3 h, 7, 14 and 28 days. For each measurement point, the samples were prepared in triplicate.

2.3.3. Cultivable cells enumeration

The enumeration of viable cells was carried out after the 3 h, 7 and 14 days of bioadhesion. The protocol used for this part is the same as described in section 2.2.3, except for the culture media. Dilutions series were then carried out and 100 μ L of the suspension were inoculated in triplicate on YPD agar medium for 5 days at 30 °C. For LAB, 100 μ L of dilution series were inoculated on LAB medium composed of 25 % (v/v) of grape juice, 0.5 % of yeast extract (Fisher BioReagent™), 2 % of agar (Fisher BioReagent™) and 1% (w/v) of glycerol with a pH adjusted to 4.8 with KOH supplemented with 1 % (v/v) of pimarin at 20 mg/mL for 7 days in anaerobiosis at 25 °C. For ABB, 100 μ L of dilution series were inoculated on LAB medium composed of 25 % (v/v) of grape juice, 0.5 % of yeast extract (Fisher BioReagent™), 2 % of agar (Fisher BioReagent™) and 1 % (w/v) of glycerol with a pH adjusted to 4.8 with KOH supplemented with 1 % (v/v) of pimarin at 20 mg/mL and 1 % (v/v) of chloramphenicol at 30 mg/mL for 5 days at 25 °C. The results are then expressed as Colony Forming Unit per cm² (CFU/cm²).

2.3.4. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Bioadhered cells and biofilms were observed by SEM. The adhered cells were fixed on the stainless-steel coupon by a solution of 3% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer of pH 7.2 over one night at 4 ° C. The coupon was washed with 0.05 mM phosphate buffer for 10 min. Two successive immersions were performed for dehydration for 10 min in solutions of increasing ethanol content (50, 75, 90, 100%). The coupon was placed in solution of ethanol-acetone (70/30, 50/50, 30/70, 100%) for 10 min. Next, the coupon was air-dried and stored at room temperature. The sample were coated with a thin platinum layer and then observed with a Zeiss Gemini 300 scanning electron microscope at the Bordeaux Imaging Center facilities of Bordeaux University. SEM was performed using a working distance between 6.8 mm and 7.1 mm.

2.4. Statistical analysis

Kruskal-Wallis statistical test (*agricolae* package, R, p value < 0.05), multi-way Anova (*agricolae* package, R, p-value <0.05), and Principal Component Analysis (PCA) were performed using R and R-packages *agricolae* (Mendiburu, 2021).

3. Results

3.1. Effect of biotic factors on *B. bruxellensis* on cell surface and bioadhesion properties

In our experimental conditions, the effect of 3 pH values (3.6, 3.8 and 4.1) and 3 ethanol concentrations (5 %, 10 %, and 14 % (v/v)) on surface charge (Zeta potential), surface hydrophobicity (Affinity to Chloroform and Hexadecane), pseudohyphae cells formation and on the bioadhesion properties of *B. bruxellensis* was considered. The variance analysis made it possible to highlight the effect of each factor on the parameters studied (Fig. 24). The genetic group and strain factors explained more than 50 % of the results obtained for all the parameters studied. The variance of the surface charge with Zeta potential analysis was 57 % mediated by the genetic group followed by the 20.3 % for the strain factor. No effect of pH was highlighted. Alcohol has only a weak effect with 2.6 % of the variance explained. Regarding hydrophobicity, the strain effect is even higher, explaining for the affinity to chloroform and hexadecane, 62 % and 65 % of the total variance, respectively. The effect of alcohol and pH are again negligible with 0.02 % and 2.4 % for chloroform and 0 % and 0.1 % for hexadecane, respectively. The combination of factors is also negligible. The variance of formation of pseudohyphae cells is

also explained at 36.5 % and 35.5 % by the strain and the genetic group, respectively with alcohol/genetic group interaction at 5.2 %. Finally, for bioadhesion, the variance of viable cells adhesion is explained at 37.3 % by the strain and at 25.2 % by the genetic group. The interaction of alcohol parameter with the genetic group and the strain explains from 5.8 % to 6.3 % of the total variance of bioadhesion. Finally, the concentration of bioadhered dead cells is again impacted here initially by the strain at 31.3 % and then by the genetic group up to 18.2 %. Moreover, it is possible to see that alcohol explains 9.9 % the bioadhesion of dead cells with interaction with the genetic group and the strain (14.2 % and 18.2 % of the explained variance of bioadhesion). Indeed, with the increase in alcohol concentration, the number of bioadhered dead cells increases significantly (Anova, p-value <0.05). Thus, the pH and Alcohol does not appear to have a significant effect on surface and bioadhesion properties of *B. bruxellensis*.

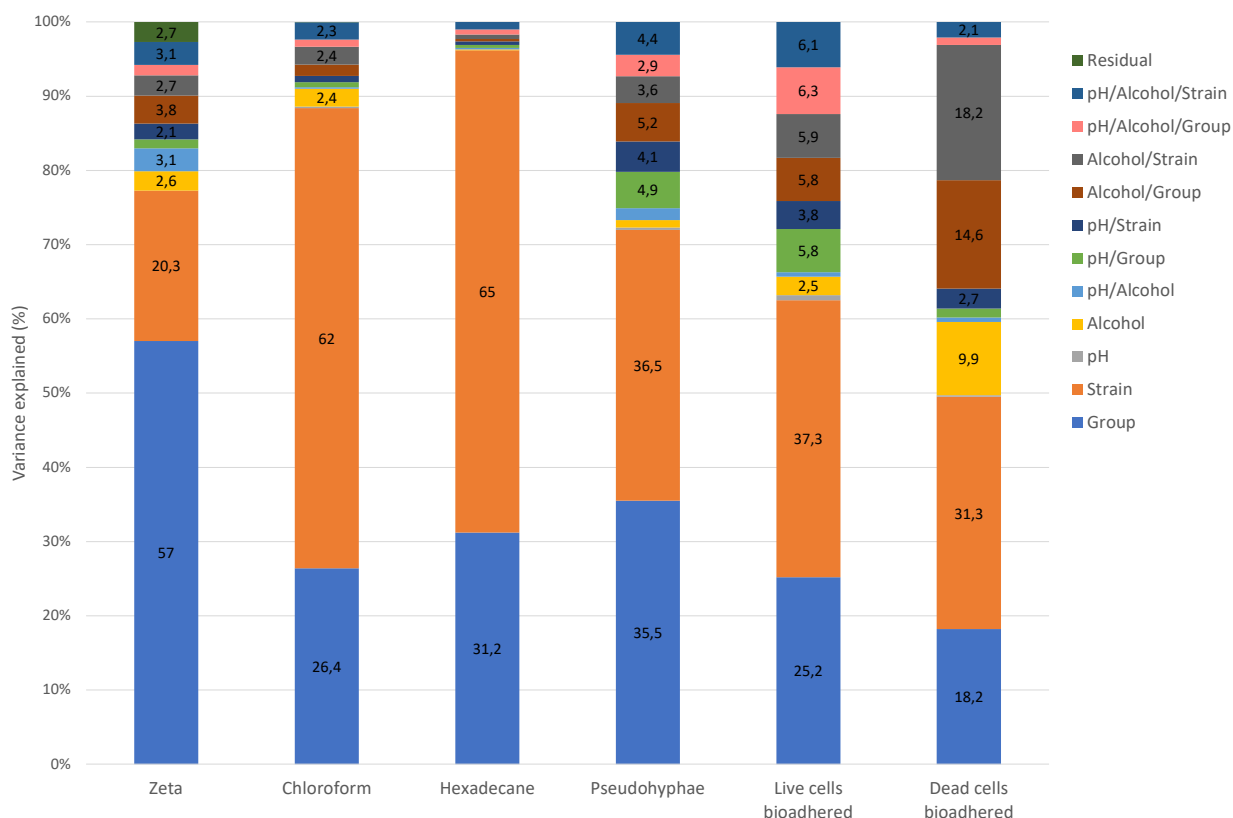


Figure 24 : Percentage of variance explained for the different factors and each parameter analyzed (multi-way Anova, p-value <0.05)

3.2. Mixed-strains biofilm

The establishment of mixed-strains biofilm was monitored with two genetically distinct strains of *B. bruxellensis* and contrasting bioadhesion properties in order to follow over time the evolution of the biofilm and the strain dynamics. The MX1 composed of strains AWRI 1499 and AWRI 1608 shows a population level of cultivable cells of the biofilm similar as for AWRI 1608 strain with an increase of cultivable cells during the first 7 days (from 7.43×10^4 CFU/cm² to 7.33×10^5 CFU/cm²), followed by a slight decrease until day 14 (Fig 25A). The AWRI 1499 strain has a cultivable cells level which decreases over time. Figure 25B shows the relative proportion of each strain present among the cultivable cells population at each monitoring point. The dominant strain on day 1, on day 7 and day 14 is AWRI 1608 thus explaining that MX1 followed similar behavior to AWRI 1608. The MX2 comprising strains AWRI 1608 and CRBO L17109 showed similar trend to MX1 with concentration over time comparable to strain AWRI 1608 (Fig. 25C). Monitoring the proportion of each strain showed that strain AWRI 1608 on day 1 corresponds to only 56.8 % of the cultivable cells whereas strain CRBO L17109 is present at 43.2%. However, AWRI 1608 is then dominant with 98.9 % and 94.3 % on day 7 and 14, respectively (Fig. 25D). The MX3 is composed of strains AWRI 1499 and CRBO 17109 (Fig. 25E). On day 1, the MX3 population level of cultivable cells is closed to the CRBO L17109 strain with 2.94×10^4 CFU/cm² and 5.94×10^4 CFU/cm², respectively. A decrease in population level is noticeable on day 7 for strains AWRI 1499 and CRBO L17109 biofilms while the concentration of MX3 increased to 6.57×10^4 CFU/cm² thus showing a potential positive effect of the presence of the two strains for biofilm establishment. On day 14, an important decrease in the population level is observed for MX3 thus passing to 1.33×10^3 CFU/cm² while the concentration of the strains alone remains mostly stable. MX3 is mainly composed of yeast cells belonging to the CRBO L17109 strain with a proportion of 65.6 % and 92.3 % on days 1 and 7 (Fig. 25F). On day 14, the proportion of CRBO L17109 decreases to 71.4 % which can explain the decrease in the population level of cultivable cells. Finally, the MX4 composed of strains AWRI 1608 and CBS 2499 shows a similar trend to single strains AWRI 1608 and CBS2499 biofilms with an increase in the population level of cultivable cells over the 14 days (Fig. 25G). The proportion in each strain in MX4 is relatively similar on day 1 with 60 % and 40 % of culturable cells for AWRI 1608 and CBS 2499, respectively (Fig. 25H). On day 7, the gap between the 2 strains increases and AWRI 1608 represents 70.6 % of the population in cultivable cells. However, on day 14 a reversal of proportion is observable. The CBS 2499 strain becomes the dominant one with a proportion of 71.3 %.

A monitoring of the thickness of the biofilm was also carried out in order to see the effect of the presence of 2 different strains on the formation of the biofilm. Figure 26 shows the thickness of the biofilms of the mixes compared to the biofilm formed by the single strains. It was observed that AWRI 1499 did not form a continuous biofilm on the stainless-steel coupon, but micro-colonies scattered on the surface of the latter. Thus, the AWRI 1499 strain is not shown in Figure 3. The AWRI 1608 strain formed a homogeneous biofilm on stainless steel with a gradually increase in the thickness of the biofilm over time from 7.25 μm on day 1 to 12 μm on day 7 and finally to 16.7 μm on 14 days. Strain CRBO L17109 has a relatively stable thickness over time from 6.11 μm to 7.65 μm between day 1 and day 14.

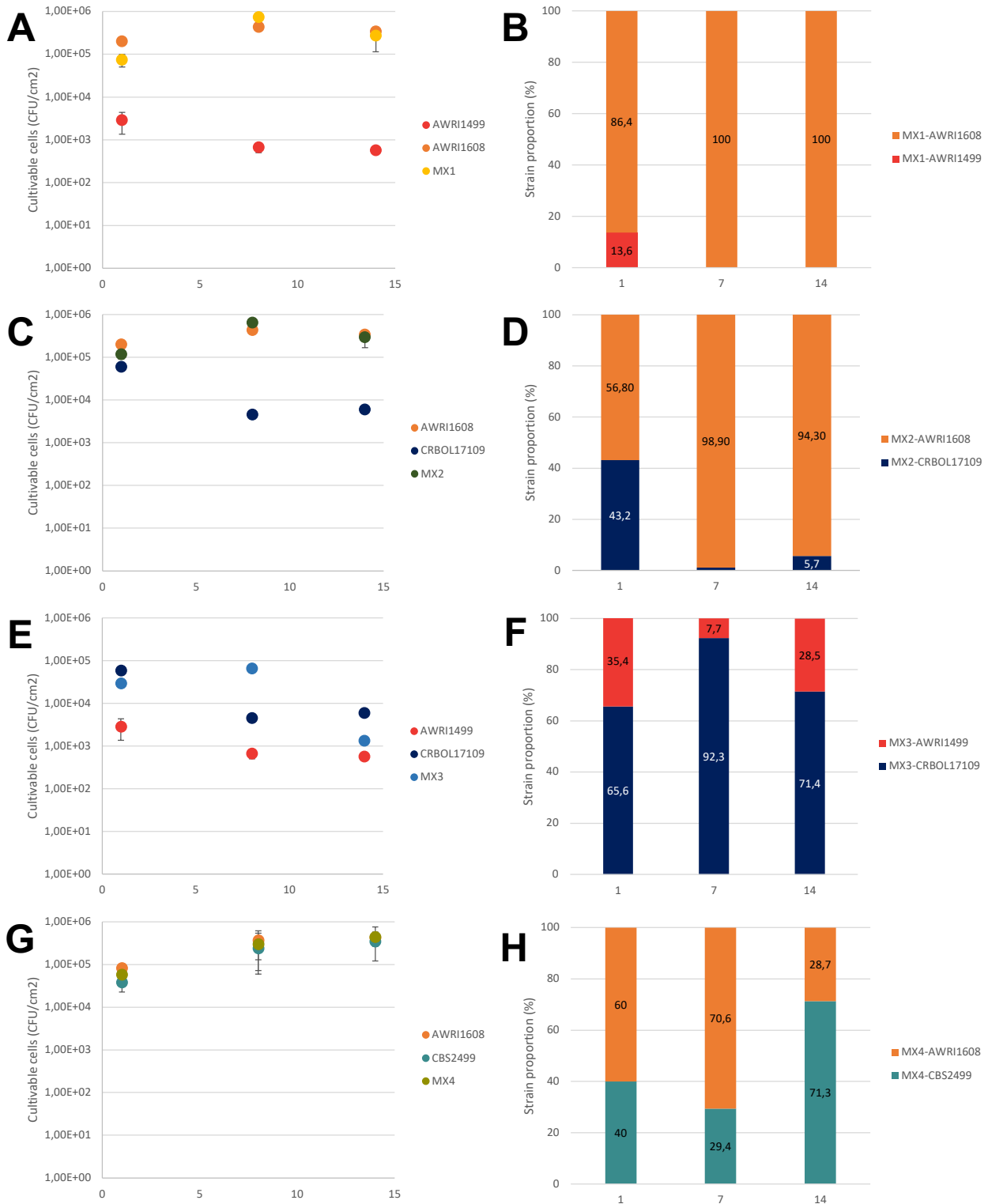


Figure 25 : Dynamic of bioadhesion and biofilm mix formation between 2 genetically different strains of *B. bruxellensis*. A, C, E, G represent the population level of cultivable cells of each mix and single cell biofilm. B, D, F, H represent the proportion of each strain composing the mixes over time (n=90 colonies).

The MX1 and MX2 have similar thicknesses over time no significant differences are observed between the 2 mixes for a given day (p -value >0.05). The thickness of these mixes increases between day 1 and day 7 and remains stable between day 7 and day 14. The MX1 and MX2 mixes are both composed by AWRI 1608 strain; the thickness of these mixes is similar to that of the AWRI 1608 single strain on days 1 and 7 (p -value >0.05) thus indicating a strong contribution of the AWRI 1608 strain during the first 7 days of the biofilm formation. In addition, on day 14, the AWRI 1608 strain has a significantly greater thickness than that of MX1 and MX2 (p -value <0.05). Finally, MX3 composed of strains AWRI 1499 and CRBO L17109 has the lowest thickness of the 3 mixes with an increase between day 1 and day 7 from 5.14 μm to 7.26 μm respectively. The MX3 comprising strain CRBO L17109 does not differ significantly from strain CRBO L17109 alone on days 1 and 7 (p -value >0.05). On day 14, the thickness is no longer measurable because only micro-colonies of cells are present on the surface of the stainless steel revealing a dispersion of bioadhered cells between day 7 and day 14.

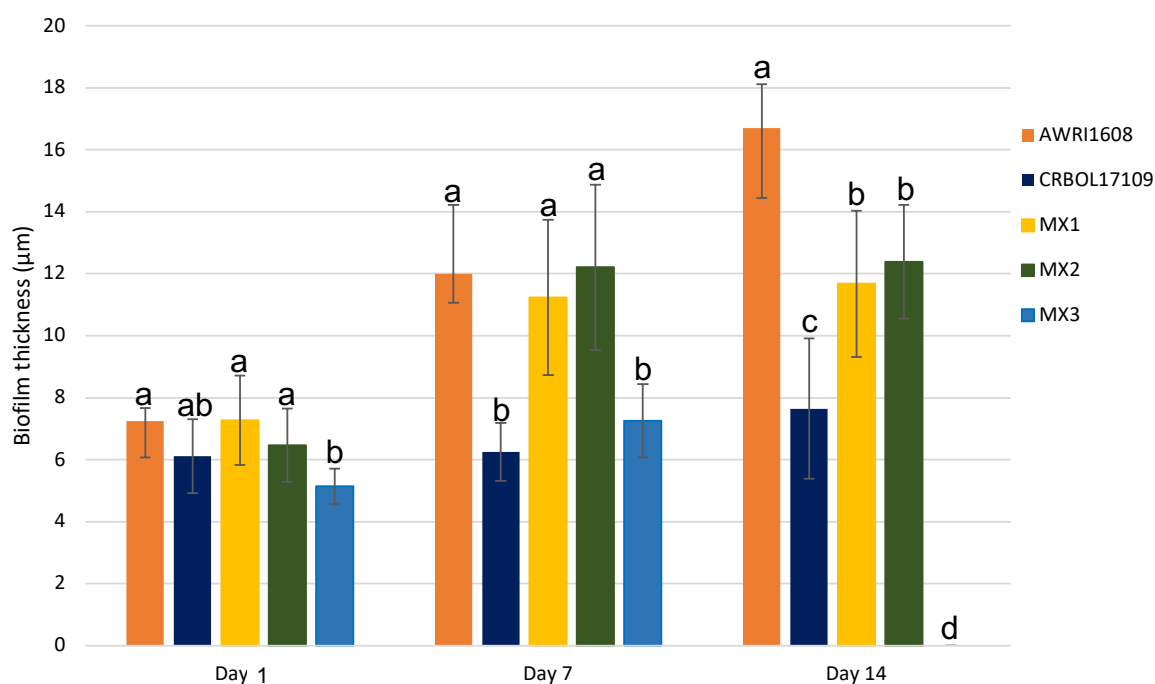
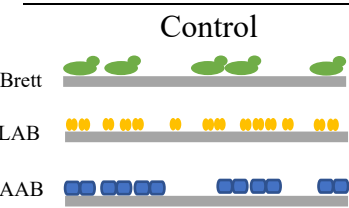
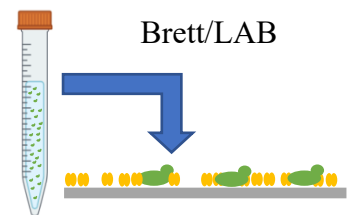
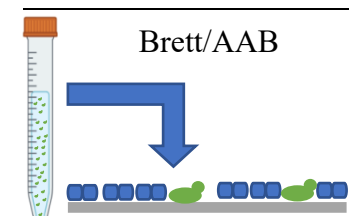
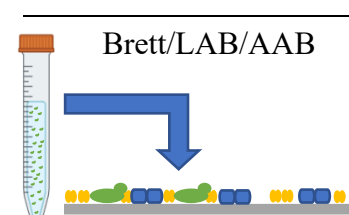


Figure 26 : Monitoring the thickness of biofilms over time. Upper letter represents groups significantly different per day as defined by Kruskal-Wallis test (Agricolae package, R, p -value <0.05).

3.3. Pluri-species biofilm

The study of pluri-species biofilms was carried out by associating *B. bruxellensis* either with LAB (*O. oeni*), AAB (*A. pasteurianus*) or with LAB and AAB at the same time. Bioadhesion was performed sequentially. Thus, the bacteria adhered for 48 hours before the addition of *B. bruxellensis*. The cultivable population level of bacteria shows after 48 hours a higher bioadhesion capacity of AAB with 8.2×10^4 CFU/cm² against 6.54×10^3 CFU/cm² for LAB (Table 6).

Table 6 : Monitoring over time of populations of culturable microorganisms in pluri-species biofilms.

		Bacterial bioadhesion (48 h)	<i>Brettanomyces</i> bioadhesion (3 h)	Biofilm 7 days	Biofilm 14 days	Biofilm 28 days
		Cultivable (CFU/cm ²)	Cultivable (CFU/cm ²)	Cultivable (CFU/cm ²)	Cultivable (CFU/cm ²)	Cultivable (CFU/cm ²)
 <p>Control</p>	Brett	/	$4.28 \times 10^5 \pm 5.01 \times 10^4$	$8.28 \times 10^4 \pm 3.00 \times 10^4$	$1.51 \times 10^5 \pm 9.81 \times 10^4$	$6.30 \times 10^4 \pm 2.21 \times 10^4$
	LAB	$6.54 \times 10^3 \pm 1.53 \times 10^2$	/	ND	ND	$1.60 \times 10^5 \pm 4.81 \times 10^4$
	AAB	$8.20 \times 10^4 \pm 5.01 \times 10^4$	/	ND	ND	ND
 <p>Brett/LAB</p>	Brett	/	$3.31 \times 10^3 \pm 1.34 \times 10^3$	$1.90 \times 10^3 \pm 1.15 \times 10^3$	$1.52 \times 10^3 \pm 1.62 \times 10^2$	$3.05 \times 10^3 \pm 1.9 \times 10^3$
	LAB	/	$3.87 \times 10^3 \pm 2.26 \times 10^3$	ND	ND	$7.62 \times 10^3 \pm 2.03 \times 10^3$
	AAB	/	/	/	/	/
 <p>Brett/AAB</p>	Brett	/	$3.73 \times 10^3 \pm 6.15 \times 10^2$	$1.52 \times 10^3 \pm 1.15 \times 10^3$	$2.48 \times 10^3 \pm 3.29 \times 10^2$	$1.71 \times 10^4 \pm 7.12 \times 10^3$
	LAB	/	/	/	/	/
	AAB	/	$8.18 \times 10^4 \pm 2.67 \times 10^4$	$9.51 \times 10^2 \pm 7.17 \times 10^2$	ND	ND
 <p>Brett/LAB/AAB</p>	Brett	/	$4.50 \times 10^3 \pm 4.17 \times 10^2$	$1.05 \times 10^3 \pm 6.60 \times 10^2$	$2.00 \times 10^3 \pm 7.58 \times 10^2$	$4.19 \times 10^3 \pm 1.63 \times 10^3$
	LAB	/	$5.15 \times 10^3 \pm 3.47 \times 10^3$	ND	ND	$2.49 \times 10^4 \pm 3.31 \times 10^3$
	AAB	/	$7.08 \times 10^4 \pm 2.79 \times 10^4$	$2.00 \times 10^3 \pm 2.90 \times 10^2$	ND	ND

For all biofilms, the population level of cultivable cells of *B. bruxellensis* is lower than when *B. bruxellensis* is bioadhered alone. Indeed, after 3 hours of bioadhesion on stainless steel coupons with bacteria biofilm, the population level of bioadhered *B. bruxellensis* were respectively 3.31×10^3 CFU/cm², 3.73×10^3 CFU/cm² and 4.50×10^3 CFU/cm² for the conditions Brett/LAB, Brett/AAB and Brett/LAB/AAB, against 4.28×10^5 CFU/cm² when *B. bruxellensis* was alone. Thus, a significative decrease of *B. bruxellensis* bioadhesion was show when bacteria were previously bioadhered (Kruskal-Wallis, p-value < 0.05). No significant differences were observed during the first 14 days (p-value > 0.05) for *B. bruxellensis* alone. This same observation was made in the condition Brett/LAB where the population of *B. bruxellensis* remains stable throughout the 28 days of this study. *B. bruxellensis* populations were also stable between the day 7 and the day 14 for the Brett/AAB and Brett/LAB/AAB condition (p-value > 0.05). Moreover, for these 2 conditions, a significant increase in the population level of *B. bruxellensis* is showed between day 14 and day 28 (p-value < 0.05). On day 28, the level of cultivable cells of *B. bruxellensis* of the condition Brett/AAB is like the *B. bruxellensis* control showing that in the long term the effect of acid acetic bacteria doesn't seem to affect the formation of biofilm in *B. bruxellensis* (p-value > 0.05). Moreover, in the Brett/LAB/AAB and Brett/LAB at 28 days, the population level of *B. bruxellensis* was 1 log (p-value < 0.05) less important than when acetic acid bacteria were present with *B. bruxellensis*. Concerning bacteria, the LABs were not detected on days 7 and 14 in control condition but quantified at 1.6×10^5 CFU/cm² on day 28. AABs control have never been counted on agar medium despite observations in scanning electron microscopy (SEM) on stainless steel (data not shown) suggesting that they could be present in the viable but non-cultivable form. After the 3 hours of bioadhesion of *B. bruxellensis* on the coupons with the bioadhered bacteria, the population levels of AAB and LAB was similar than the levels before the addition of *B. bruxellensis* (p-value > 0.05). As for the LAB control, the LAB count revealed no presence of cultivable cells on days 7 and 14 but observations were made by SEM suggesting that the cells were in a non-culturable physiological state. In the Brett/LAB condition on day 28, 7.62×10^3 CFU/cm² of cultivable cells could be counted which is much lower than for the LAB control. For the Brett/LAB/AAB condition, the LAB population level on day 28 was higher than the Brett/LAB condition with 2.49×10^4 CFU/cm². For AABs, no count was possible for the control during the 28 days of follow-up. However, in the presence of *B. bruxellensis* and LAB, an enumeration was possible on day 7 with lower population level of 9.51×10^2 CFU/cm² and 2.0×10^3 CFU/cm² respectively for Brett/AAB and Brett/LAB/AAB conditions comparing with the control. In the Brett/AAB condition, the loss of cultivability of AAB on day 14 is linked

with a significant increase in the population level of *B. bruxellensis* between day 14 and day 28. In addition, observations by SEM could be made on days 14 and 28 (Fig.27).

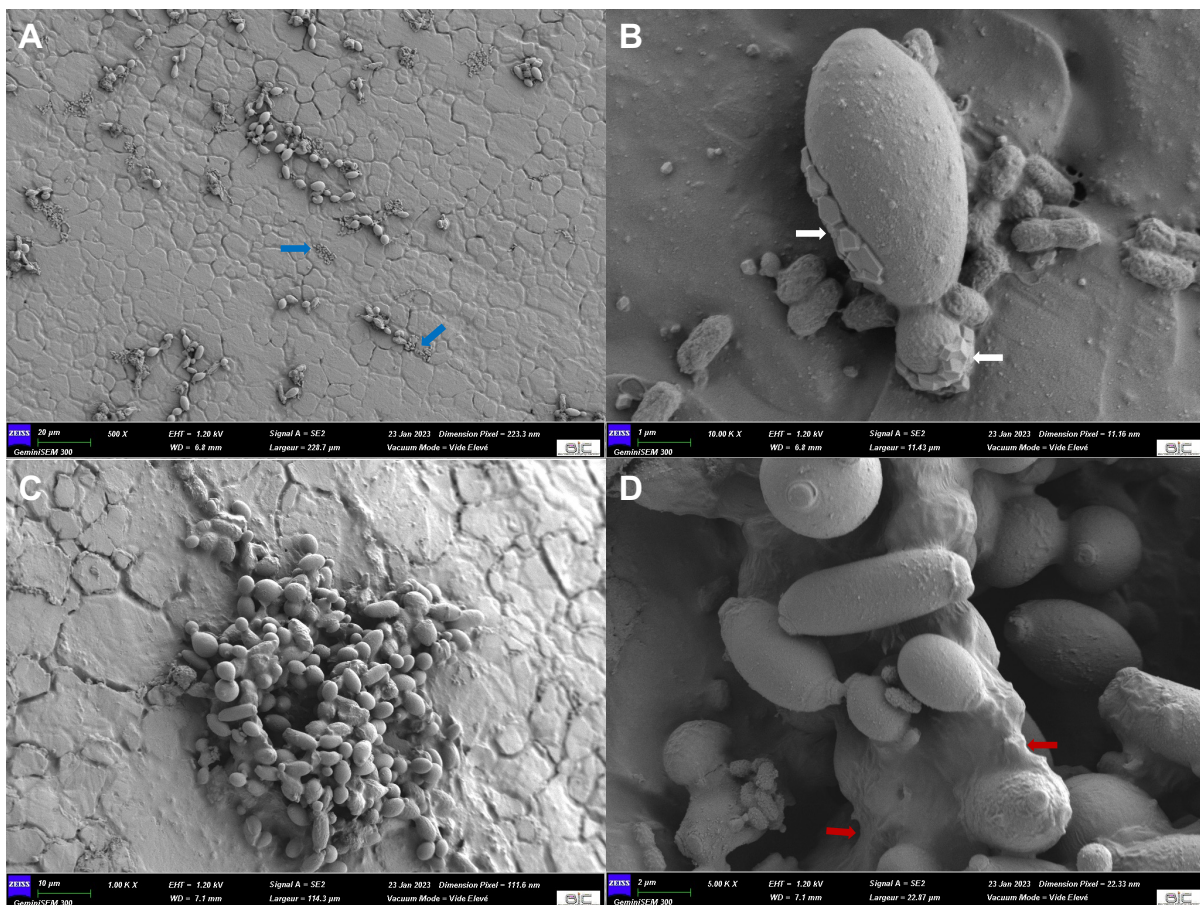


Figure 27 : Scanning electron microscopy (SEM) observation of bioadhesion at different stages. A represents cells of *B. bruxellensis* and AAB (blue arrows) at day 14 with magnification x400; B is characterized by a magnification x10 000 of the Brett/AAB condition on day 14 highlighting the presence of crystals (white arrows) around the *B. bruxellensis* cell; C is an observation of a microcolony of *B. bruxellensis* and LAB on day 28 at magnification x 1000; D represents a magnification x 5000 of a microcolony with extracellular matrix (red arrows).

Scanning electron microscopy observations highlighted the arrangement of the different cells on the surface of the stainless-steel coupon. Figure 27A shows an overview of the Brett/AAB status on day 14 with 500x magnification. The microorganisms present on the surface of the coupon are randomly distributed. The presence of AAB is evidenced even if no culturable cells were detected. A magnification x1000 (Fig. 27B) makes it possible to see with precision the organization of *B. bruxellensis* and the associated AABs. It is possible to see on the surface of a *B. bruxellensis* cell an ordered agglomeration of crystals also presents around the budding cell; no identification could be made on the origin of these crystals. AABs are also present in contact with the yeast cell. On day 28, microcolonies of LAB associated to *B. bruxellensis* were observed in the Brett/LAB condition; figure 27C shows these micro-colonies at a magnification

of 1000x. There is a complex architecture with empty areas. A magnification x5000 (Fig. 27D) highlighted the formation of an extracellular matrix on the surface of the cells characterized by a film covering the cells and having an involvement in the biofilm structure. It is also possible to see within this biofilm the presence of LAB bound to *B. bruxellensis* cells.

4. Discussion

Brettanomyces bruxellensis was reported to be associated with stressful environments due to its physicochemical properties in the presence of other microorganisms competing for nutrients. (Conterno et al., 2006). Thus, in this study the effect of abiotic factors (pH and ethanol concentration) on surface properties, pseudohyphae growth and bioadhesion was studied to evaluate their regulatory role on biofilm formation in *B. bruxellensis*. In addition, the effect of the presence of other strains of *B. bruxellensis* but also other microorganisms during bioadhesion was studied in order to monitor population dynamics and the effect on biofilm formation.

4.1. Abiotic factors poorly impact on cell surface and bioadhesion properties

Wine is characterized by low pH (ranging from 2.9 to 4.0) and high ethanol concentration (from 12.5 to 15.5 % alc vol. in average). Those two main factors in wine environments can have a strong effect on the growth of microorganisms. Indeed, *B. bruxellensis* was isolated from beverages such as wine, but also from beer and kombucha with acidic pH up to 2.5 for kombucha (de Miranda et al., 2022) and ethanol concentrations up to 15% (v/v) for some red wines. *B. bruxellensis* has been shown to have significant strain tolerance to the acidic pH values and high ethanol concentrations (Oswald and Edwards., 2017; Cibrario et al., 2020).

The pH and ethanol concentration have been identified as having effects on the surface properties of cells that can then directly affect the bioadhesion abilities of microorganisms. Indeed, it has been shown that pH changes could induce a change in cell surface charge impacting electrostatic interactions between cells and support (Boutaled et al., 2007). Ethanol has a fluidifying action of the membranes modifying the membrane composition playing an important role in the secretion of adhesion proteins (Alexandre et al. 1994). However, in the present study, the pH and ethanol concentration showed only a negligible effect on the surface electronegativity of *B. bruxellensis*. Prior results to this study carried out on a different medium have shown an increase in surface electronegativity along with an increase in pH value from 2 to 3.5 and then stabilization was observed for some strains according to the genetic group (Dimopoulou et al., 2019). This latter observation is congruent with our data showing that the

genetic group is the most explanatory factor in the surface electronegativity which is directly influenced by the composition of membrane proteins and polysaccharides (Hong and Brown., 2010; Halder et al., 2015). The pH and alcohol concentrations have also no effect on hydrophobicity; indeed, more than 60% of the variance of this phenotype is mediated by the strain and the genetic group. However, in *Saccharomyces cerevisiae*, hydrophobicity is higher in the presence of alcohol (Alexandre et al., 1998). In the present study, the increase in alcohol concentration from 5 % to 14 % results only in a slight increase in hydrophobicity. The fact that the strain explains more than 60 % of the phenotype suggest that hydrophobicity could be directly related to the presence of specific genes and/or gene expression associated with the phenotype. Indeed, in *S. cerevisiae*, hydrophobicity is impacted by the expression of genes of the *FLO* family exerting a major influence on the surface properties and bioadhesion of the species. Regarding differentiation in pseudohyphae cells, here again the abiotic factors have no effect on this phenotype being explained to more than 70 % by the strain and the genetic group. This cellular morphology is mostly observed in triploid genetic groups such as the Teq/EtOH group and Beer (Chapter 2). However, in other species encountered in oenology such as *Hanseniaspora uvarum* and *S. cerevisiae*, an effect of ethanol and fusel alcohols such as tyrosol on invasive growth, a phenotype like pseudohyphae growth was reported (González et al., 2017, 2018). The presence of ethanol is perceived as a quorum-sensing molecule inducing filamentous growth (González et al., 2017); however, a variability of the response was observed depending on the strain and the species considered.

Finally, the effect of pH and ethanol concentration on bioadhesion of *B. bruxellensis* was examined. The initial study of Joseph et al (2007) showed a major effect of pH on bioadhesion and biofilm formation of *B. bruxellensis*. Indeed, a higher bioadhesion was observed from pH 3 and significant increase at pH 3.8 and 4 contrary to our observations showing no effect of pH on bioadhesion. This difference could be explained by the fact that the methods of quantification of bioadhesion are not the same but also that the medium used in both studies are totally different. In the case of Joseph et al (2007), a grape juice medium highly rich in sugars (about 80 g/L) was used while, in our study, a standard low sugars content wine-like medium was preferred (2 g/L). In *C. albicans*, pH also doesn't seem to effect bioadhesion; no significant differences are visible between pH 4 and pH 7 (Gonçalves et al., 2020). Vasconcellos et al (2014) show higher bioadhesion at pH 5.5 for *C. albicans* than at pH 7. However, the two studies used again different culture media thus showing the importance of this parameter to evaluate the bioadhesion capacity. In other species such as *Gardnerella vaginalis*, pH has no effect on bioadhesion (Bhat et al., 2012). *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus*

aureus exhibit improved bioadhesion at basic pH and inhibition of bioadhesion at acidic pH for *S. aureus* (Memple et al., 1998; Chaieb et al., 2012). In our study, ethanol concentration explains only 2.5 % the viability of bioadhered cells but however 9.9 % of the bioadhered cell mortality variance. Indeed, it was observed a higher concentration of bioadhered dead cells with an alcohol concentration of 14 %. In addition, the interaction between Alcohol/Strain and Alcohol/Genetic Group factors explained respectively 14.6 % and 18.2 % the mortality of bioadhered cells. This result could be explained by the ethanol tolerance that is different from one group to another. Indeed, strains of the Wine 1 group seem to be more resistant to high ethanol concentration than the other groups (Cibrario et al., 2020).

4.2. Effect of mixed-strain and mixed-species biofilm

Wine is an environment where it is possible to encounter an important diversity of microorganisms. Indeed, this microbial diversity strongly decrease from grape juice to wine during the vinification process; only species such as *B. bruxellensis*, LAB and AAB well adapted to the wine composition persist in wine at the end of the vinification process (Renouf et al., 2006; Camilo et al., 2022). In each wine sample, several strains of *B. bruxellensis* belonging to different genetic groups can be present simultaneously within the same winery (Cibrario et al., 2019). Therefore, we studied the effect of the presence of 2 genetically different strains on biofilm formation. It was thus shown that the biofilm was composed mainly of the strain with the highest bioadhesion capacity and that the second strain was present in small proportion. In addition, in many cases, the bioadhesion kinetics of the mixed-strain biofilm followed the bioadhesion kinetic of the dominant strain when its alone. In *Pseudomonas aeruginosa*, a similar observation was also reported: in a mixed-strain biofilm, one strain was present in higher concentrations than the other, thus showing some interaction and competition effect between the two strains (Oliveira et al., 2015). In addition, the authors showed that the presence of two strains of *P. aeruginosa* induced a significant increase in biofilm formation (Oliviero et al. 2015) which is not the case in our observations where the thickness of the biofilm is greater when strain AWRI 1608 is the only one to form biofilm. In *S. cerevisiae*, adhesion is preferred between cells expressing the same surface properties to promote biofilm resistance (Mitri and Richard Foster., 2013). In *Escherichia coli*, a synergistic effect was also observed on biofilm formation during strain co-cultures. In MX4, composed of 2 strains with significant bioadhesion properties, a change in the majority strain over time was observed that could be induced by a competition between cells for nutrients (Xavier and Foster 2006). Thus, the fact that one strain moves from minority to majority can be explained by higher ability to

metabolize nutrients compare to the other one. The lack of nutrients could also lead to the death of part of one strain population thus releasing nutrients through autolysis into the environment that can be assimilated by the other strain. Thus, a population dynamic of *B. bruxellensis* strains was observed in the biofilm. This population dynamic at strain level is also observable in the cellar; within the same batch of wine, the percentage of planktonic *B. bruxellensis* strain is variable over time (Cibrario., 2017).

In wine, other microorganisms can interact with *B. bruxellensis* such as *Oenococcus oeni* and *Acetobacter pasteurianus*, with for the latter, a negative effect on the sensory qualities of wine, eg production of acetic acid and ethyl acetate (du Toit and Pretorius., 2002; Zepeda-Mendoza et al., 2018). Since *O. oeni* was reported to have bioadhesion properties (Bastard et al., 2016; Coelho et al., 2019), the formation of mixed-species biofilm between *O. oeni* and *B. bruxellensis* was studied. Results showed a decrease of bioadhesion property of *B. bruxellensis* in the presence of *O. oeni*. However, it was also observed the formation of structured microcolonies where the 2 species were organized in the form of biofilm covered with extracellular matrix. This matrix is also present in the monospecies biofilms of *B. bruxellensis* thus encompassing cells (Lebleux et al. 2020). The *O. oeni* enumeration on selective medium was not possible on days 7 and 14 but on days 1 and 28 indicating the presence of the bacteria, also confirmed by scanning electron microscopy observations (SEM). This absence of colonies on medium can potentially be explained by the physiological state of cells in a viable but non cultivable (VBNC) physiological form previously demonstrated in this species (Millet and Lovaud-Funel., 2000). A similar observation was also made in our study, where *A. pasteurianus* is no longer detected on solid medium from day 7 while cells are observed by SEM. Under our experimental conditions, the loss of cultivability of *A. pasteurianus* is linked with an increase in the population level of *B. bruxellensis*. This increase could be explained by the death of AABs and then the release of metabolites by autolysis assimilable by *B. bruxellensis* allowing it to grow in the environment. AABs and LABs have been shown to bioadhere in contact with *B. bruxellensis*. The formation of mixed-species biofilm (yeast/bacteria) was also observed in other microorganisms such as *C. albicans* and *S. epidermidis* where cooperation was reported between these 2 species; the formation of extracellular matrix of one protects the other from specific antibiotic activity (Adam et al., 2002). In the field of fermentation, mixed-species biofilms are also observed, particularly in the case of rice wine fermentation where biofilms of *S. cerevisiae* and *Lacticaseibacillus casei* are produced; however, when they were present alone, no biofilm observations are made (Kawarai et al., 2007; Furakawa et al., 2011). In other cases, the presence of one microorganism may inhibit the formation of biofilm from another.

This is the case for *Lactiplantibacillus paraplantarum* which, in the presence of *Listeria monocytogenes*, produces a bacteriocin inhibiting the formation of biofilm of the latter (Winkelströter et al., 2015; Yuan et al., 2019). The decrease in the bioadhesion of *B. bruxellensis* could be explained by the fact that a competition between microorganisms is established in connection with access to the nutrient source or because of the production of metabolite by the bacteria present before *B. bruxellensis*. The presence of microorganism could also modify the metabolites which can modify the surface physico-chemical properties of the material.

5. Conclusion

This study was conducted on several strains representative of the genetic diversity of the species and with contrasting surface and bioadhesion properties. Our data showed that the abiotic factors such as pH and ethanol concentration have negligible effects on surface properties. An effect of ethanol was highlighted on bioadhered cell mortality probably linked to different tolerance of ethanol of *B. bruxellensis* at strain and genetic group levels. The strain and group factors being the most explanatory in the phenotypes studied, it seems that these phenotypes are the result of genetic determinism and gene expression. In *S. cerevisiae*, hydrophobicity, pseudohyphae cell formation and bioadhesion have been shown to be directly impacted by the expression of *FLO* genes family that could be good candidates to further studied the genetic mechanisms underlying those phenotypes in *B. bruxellensis* (Smit et al., 1992; Mortensen et al., 2007; van Mulder et al., 2009; Govender et al., 2010; Zhang et al., 2021).

The diversity of microorganisms found in wine and in the cellar during winemaking and wine ageing process were considered. Indeed, two strains of *B. bruxellensis* can form a biofilm and the most bioadhesive one is dominant in its composition. However, some competition is observed in the formation of the biofilm as evidenced by a lower thickness of mixed-strains biofilms compared to a single strain biofilm. Finally, in our experimental conditions, from a mixed-species point of view, our results show a decrease in biofilm formation for *B. bruxellensis* but with the formation of structured microcolonies with LAB and AAB. In addition, the loss of viability of AAB appears to lead to an increase in *B. bruxellensis* population levels over time. However, extracellular matrix production can participate in the persistence of the species in the environment and thus contamination of wines. This presence of plurispecies biofilm implies the implementation of specific cleaning procedures allowing their removal.

References

- Adam, B., Baillie, G.S., Douglas, L.J., 2002. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology* 51, 344–349. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-4-344>
- 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 Microbiology* 42, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.012>
- Alexandre, H., Bertrand, F., Charpentier, C., 1998. Ethanol induced yeast film formation with cell surface hydrophobicity as a major determinant. *Food Technology and Biotechnology* 36, 27–30.
- Alexandre, H., Rousseaux, I., Charpentier, C., 1994. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol Lett* 124, 17–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07255.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>
- 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. *Frontiers in Microbiology* 7.
- Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J., Van Oss, C.J., 1996. Microbial adhesion to solvents: A novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7, 47–53. [https://doi.org/10.1016/0927-7765\(96\)01272-6](https://doi.org/10.1016/0927-7765(96)01272-6)

- Bhat, G., Kotigadde, S., Kotian, S., 2012. Effect of pH on the adherence, surface hydrophobicity and the biofilm formation of *Gardnerella vaginalis*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 6, 967–969.
- Boutaleb, N., Latrache, H., Sire, O., 2008. Interactions bactéries-matériaux dans les canalisations d'eau potable. Rôle des propriétés physico-chimique de surface sur le pouvoir d'adhésion. *Tech. Sci. Meth.* 11, 73–80.
- Bridier, A., Briandet, R., 2022. Microbial Biofilms: Structural Plasticity and Emerging Properties. *Microorganisms* 10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010138>
- Camilo, S., Chandra, M., Branco, P., Malfeito-Ferreira, M., 2022. Wine Microbial Consortium: Seasonal Sources and Vectors Linking Vineyard and Winery Environments. *Fermentation* 8. <https://doi.org/10.3390/fermentation8070324>
- Carpena, M., Fraga-Corral, M., Otero, P., Nogueira, R.A., Garcia-Oliveira, P., Prieto, M.A., Simal-Gandara, J., 2021. Secondary aroma: Influence of wine microorganisms in their aroma profile. *Foods* 10. <https://doi.org/10.3390/foods10010051>
- Chaieb, K., Chehab, O., Zmantar, T., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., 2007. In vitro effect of pH and ethanol on biofilm formation by clinical ica-positive *Staphylococcus epidermidis* strains. *Annals of Microbiology* 57, 431–437. <https://doi.org/10.1007/BF03175085>
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J. -n., Pons, M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60, 165–178. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740600205>
- Cibrario, A., 2017. Diversité génétique et phénotypique de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis*: influence sur son potentiel d'altération des vins rouges (These de doctorat). Bordeaux.
- Cibrario, A., Avramova, M., Dimopoulou, M., Magani, M., Miot-Sertier, C., Mas, A., Portillo, M.C., Ballestra, P., Albertin, W., Masneuf-Pomarede, I., Dols-Lafargue, M., 2019. *Brettanomyces bruxellensis* wine isolates show high geographical dispersal and long persistence in cellars. *PLoS ONE* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222749>
- Cibrario, A., Miot-Sertier, C., Paulin, M., Bullier, B., Riquier, L., Perello, M.-C., de Revel, G., Albertin, W., Masneuf-Pomarede, I., Ballestra, P., Dols-Lafargue, M., 2020. *Brettanomyces bruxellensis* phenotypic diversity, tolerance to wine stress and wine spoilage ability. *Food Microbiology* 87. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103379>

- Coelho, C., Gougeon, R.D., Perepelkine, L., Alexandre, H., Guzzo, J., Weidmann, S., 2019. Chemical Transfers Occurring Through *Oenococcus oeni* Biofilm in Different Enological Conditions. *Frontiers in Nutrition* 6.
- Connell, L., Stender, H., Edwards, C.G., 2002. Rapid Detection and Identification of *Brettanomyces* from Winery Air Samples Based on Peptide Nucleic Acid Analysis. *Am J Enol Vitic.* 53, 322–324.
- Conterno, L., C.M.L. Joseph, 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, 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>
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Curtin, C., Kennedy, E., Henschke, P.A., 2012. Genotype-dependent sulphite tolerance of Australian *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis* wine isolates. *Lett Appl Microbiol* 55, 56–61. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03257.x>
- Czaczyk, Myszk, 2007. Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Its Role in Microbial Biofilm Formation. *Pol. J. Environ. Stud.* 16, 799–806.
- de Miranda, J.F., Ruiz, L.F., Silva, C.B., Uekane, T.M., Silva, K.A., Gonzalez, A.G.M., Fernandes, F.F., Lima, A.R., 2022. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. *Journal of Food Science* 87, 503–527. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>
- Dimopoulou, M., Renault, M., Dols-Lafargue, M., Albertin, W., Herry, J.-M., Bellon-Fontaine, M.-N., Masneuf-Pomarede, I., 2019. Microbiological, biochemical, physicochemical surface properties and biofilm forming ability of *Brettanomyces bruxellensis*. *Annals of Microbiology* 69, 1217–1225. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01503-5>
- Du Toit, Pretorius, 2002. The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking.
- Fathollahi, A., Coupe, S.J., 2021. Effect of environmental and nutritional conditions on the formation of single and mixed-species biofilms and their efficiency in cadmium removal. *Chemosphere* 283, 131152. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131152>

- Flemming, H.-C., Neu, T.R., Wozniak, D.J., 2007. The EPS matrix: the “house of biofilm cells.” *J Bacteriol* 189, 7945–7947. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>
- Flemming, H.-C., Wuertz, S., 2019. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 17, 247–260. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9>
- Fugelsang, K.C., 1997. *Wine Microbiology*. Springer US, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6970-8>
- FURUKAWA, S., NOJIMA, N., YOSHIDA, K., HIRAYAMA, S., OGIHARA, H., MORINAGA, Y., 2011. The Importance of Inter-Species Cell-Cell Co-Aggregation between *Lactobacillus plantarum* ML11-11 and *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 in Mixed-Species Biofilm Formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75, 1430–1434. <https://doi.org/10.1271/bbb.100817>
- Gammacurta, M., Marchand, S., Moine, V., de Revel, G., 2017. Influence of different yeast/lactic acid bacteria combinations on the aromatic profile of red Bordeaux wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97, 4046–4057. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8272>
- Gonçalves, B., Fernandes, L., Henriques, M., Silva, S., 2020. Environmental pH modulates biofilm formation and matrix composition in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling* 621–630. <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1793963>
- González, B., Mas, A., Beltran, G., Cullen, P.J., Torija, M.J., 2017. Role of mitochondrial retrograde pathway in regulating ethanol-inducible filamentous growth in yeast. *Frontiers in Physiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00148>
- González, B., Vázquez, J., Cullen, P.J., Mas, A., Beltran, G., Torija, M.-J., 2018. Aromatic amino acid-derived compounds induce morphological changes and modulate the cell growth of wine yeast species. *Frontiers in Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00670>
- Govender, P., Bester, M., Bauer, F.F., 2010. FLO gene-dependent phenotypes in industrial wine yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, 931–945. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2381-1>
- Halder, S., Yadav, K.K., Sarkar, R., Mukherjee, S., Saha, P., Haldar, S., Karmakar, S., Sen, T., 2015. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *SpringerPlus* 4, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1476-7>
- 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>

- Harrouard, J., Eberlein, C., Ballestra, P., Dols-Lafargue, M., Masneuf-Pomarede, I., Miot-Sertier, C., Schacherer, J., Albertin, W., 2022. *Brettanomyces bruxellensis*: Overview of the genetic and phenotypic diversity of an anthropized yeast. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/mec.16439>
- Hong, Y., Brown, D.G., 2010. Alteration of bacterial surface electrostatic potential and pH upon adhesion to a solid surface and impacts to cellular bioenergetics. *Biotechnology and Bioengineering* 105, 965–972. <https://doi.org/10.1002/bit.22606>
- 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. <https://doi.org/10.5344/ajev.2007.58.3.373>
- Kawarai, T., Furukawa, S., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2007. Mixed-Species Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Rice Wine Yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4673–4676. <https://doi.org/10.1128/AEM.02891-06>
- Kolter, R., Greenberg, E.P., 2006. Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature* 441, 300–302. <https://doi.org/10.1038/441300a>
- Lattey, K. a., Bramley, B. r., Francis, I. l., 2010. Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16, 189–202. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00069.x>
- Lebleux, M., Abdo, H., Coelho, C., Basmaciyan, L., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Roullier-Gall, C., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., Weidmann, S., Rousseaux, S., 2020. New advances on the *Brettanomyces bruxellensis* biofilm mode of life. *International Journal of Food Microbiology* 318. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108464>
- Liu, Y., Liu, G., Liu, G., Kang, L., 2023. Impact of Environmental Conditions on the Biofilm Formation of *Pseudomonas lundensis*. *Science and Technology of Food Industry* 44, 122–128. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022030335>
- Mempel, M., Schmidt, T., Weidinger, S., Schnopp, C., Ring, J., Abeck, D., Foster, T., 1998. Role of Staphylococcus Aureus Surface-Associated Proteins in the Attachment to Cultured HaCaT *Keratinocytes* in a New Adhesion Assay. *Journal of Investigative Dermatology* 111, 452–456. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00293.x>
- Mendiburu, F. de, 2021. *agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*.

- Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30, 136–141. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00684.x>
- Mitri, S., Richard Foster, K., 2013. The Genotypic View of Social Interactions in Microbial Communities. *Annual Review of Genetics* 47, 247–273. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-111212-133307>
- Mixed-Species Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Rice Wine Yeasts | *Applied and Environmental Microbiology* [WWW Document], n.d. URL <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.02891-06> (accessed 4.3.23).
- Mortensen, H. d., Dupont, K., Jespersen, L., Willats, W. g. t., Arneborg, N., 2007. Identification of amino acids involved in the Flo11p-mediated adhesion of *Saccharomyces cerevisiae* to a polystyrene surface using phage display with competitive elution. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1041–1047. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03325.x>
- Oliveira, N.M., Martinez-Garcia, E., Xavier, J., Durham, W.M., Kolter, R., Kim, W., Foster, K.R., 2015. Biofilm Formation As a Response to Ecological Competition. *PLOS Biology* 13, e1002191. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002191>
- Oswald, T.A., Edwards, C.G., 2017. Interactions between storage temperature and ethanol that affect growth of *Brettanomyces bruxellensis* in merlot wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 68, 188–194. <https://doi.org/10.5344/ajev.2017.16102>
- Piola, R., Dafforn, K., Johnston, E., 2009. The influence of antifouling practices on marine invasions. *Biofouling* 25, 633–644. <https://doi.org/10.1080/08927010903322065>
- Reisner, A., Höller, B.M., Molin, S., Zechner, E.L., 2006. Synergistic Effects in Mixed *Escherichia coli* Biofilms: Conjugative Plasmid Transfer Drives Biofilm Expansion. *Journal of Bacteriology* 188, 3582–3588. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3582-3588.2006>
- Renouf, V., Claisse, O., Miot-Sertier, C., Perello, M.-C., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2006. Study of the microbial ecosystem present on the barrels surface used during the winemaking. *Sciences des Aliments* 26, 427–445. <https://doi.org/10.3166/sda.26.427-445>
- 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. *Microbiological Research* 162, 154–167. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.02.006>

- Richards, J.J., Melander, C., 2009. Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem* 10, 2287–2294. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900317>
- Rubio, P., Garijo, 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>
- Smit, G., Straver, M.H., Lugtenberg, B.J.J., Kijne, J.W., 1992. Flocculence of *Saccharomyces cerevisiae* cells is induced by nutrient limitation, with cell surface hydrophobicity as a major determinant. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3709–3714. <https://doi.org/10.1128/aem.58.11.3709-3714.1992>
- Tempère, S., Marchal, A., Barbe, J.-C., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Marullo, P., Albertin, W., 2018. The complexity of wine: clarifying the role of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, 3995–4007. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8914-8>
- Van Mulders, S.E., Christianen, E., Saerens, S.M.G., Daenen, L., Verbelen, P.J., Willaert, R., Verstrepen, K.J., Delvaux, F.R., 2009. Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 9, 178–190. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00462.x>
- Vasconcellos, A.A.D., Gonçalves, L.M., Del Bel Cury, A.A., Da Silva, W.J., 2014. Environmental pH influences *Candida albicans* biofilms regarding its structure, virulence and susceptibility to fluconazole. *Microbial Pathogenesis* 69–70, 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.03.009>
- Winkelströter, L., Tulini, F., Martinis, E., 2015. Identification of the bacteriocin produced by cheese isolate *Lactobacillus paraplantarum* FT259 and its potential influence on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *LWT - Food Science and Technology* 64, 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.014>
- Xavier, J.B., Foster, K.R., 2007. Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 876–881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607651104>
- Yuan, L., Hansen, M.F., Røder, H.L., Wang, N., Burmølle, M., He, G., 2020. Mixed-species biofilms in the food industry: Current knowledge and novel control strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60, 2277–2293. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1632790>

- Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., Fancello, F., Zara, S., 2020. Yeast biofilm in food realms: occurrence and control. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02911-5>
- Zepeda-Mendoza, M.L., Edwards, N.K., Madsen, M.G., Abel-Kistrup, M., Puetz, L., Sicheritz-Ponten, T., Swiegers, J.H., 2018. Influence of *Oenococcus oeni* and *Brettanomyces bruxellensis* on Wine Microbial Taxonomic and Functional Potential Profiles. *Am J Enol Vitic.* 69, 321–333. <https://doi.org/10.5344/ajev.2018.17092>
- Zhang, D., Wang, F., Yu, Y., Ding, S., Chen, T., Sun, W., Liang, C., Yu, B., Ying, H., Liu, D., Chen, Y., 2021. Effect of quorum-sensing molecule 2-phenylethanol and ARO genes on *Saccharomyces cerevisiae* biofilm. *Applied Microbiology and Biotechnology* 105, 3635–3648. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11280-4>

Chapitre 4 : Identification of critical areas for
***Brettanomyces bruxellensis* detection in the**
cellar: on the origin of wine spoilage

Ce cinquième chapitre correspond en grande partie à une étude technique sous forme d'audit mise en place avec le laboratoire Excell dans différentes propriétés vinicoles afin d'identifier les zones sensibles vis-à-vis de la détection de *B. bruxellensis*. De plus, l'effet de la présence de biofilm en contact avec du vin a été étudiée afin de suivre les conséquences sur la contamination et l'altération du vin. Les résultats obtenus ont conduit à la rédaction d'un article scientifique à soumettre dans OENO One.

Identification of critical areas for *Brettanomyces bruxellensis* detection in the cellar: on the origin of wine spoilage

Paul Le Montagner^{a,b,c}, Laetitia Etourneau^b, Patricia Ballestra^a, Marguerite Dols-Lafargue^{a,d}, Warren Albertin^{a,d}, Julie Maupeu^e, Vincent Renouf^b, Isabelle Masneuf-Pomarède^{a,f}

^a Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Science Agro, OENO, UMR 1366, ISVV, 33140 Villenave d'Ornon, France

^b Laboratoire EXCELL, Floirac, France

^c Biolaffort, Floirac, France

^f ENSMAC, Bordeaux INP, 33600, Pessac, France

^e Microflora-ADERA, Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Science Agro, OENO, UMR 1366, ISVV, 33140 Villenave d'Ornon, France

^f Bordeaux Sciences Agro, 33175, Gradignan, France

Abstract

The cellar environment hosts a consortium of microorganisms on the surface of the materials and in the air. Among these microorganisms, the spoilage yeast species *Brettanomyces bruxellensis* can colonized surfaces due to its specific bioadhesion properties. In order to identify areas likely to harbor *B. bruxellensis* cells, air and surface samples were taken in different wineries in the Bordeaux region. To confirm that surfaces contaminated by *B. bruxellensis* could constitute a factor of wine contamination, yeast growth and volatile phenols production were monitored in wine in contact with biofilms on stainless steel. *B. bruxellensis* was detected in the cellar environment either in the air or on the surfaces of different materials including tartaric acid precipitation. Tank equipment that is tedious to clean has been identified as critical areas for the detection of *B. bruxellensis*. The presence of bioadhered cells in contact with wine has led to significant cells release in the wine resulting in population growth and the production of volatile phenols in concentration above the olfactory detection threshold.

1. Introduction

Fermentation is one of the most widely used preservation processes in the world. Among the types of fermentation, the winemaking process related to the transformation of grapes into wine involves a consortium of microorganisms that may originate from grapes or cellars (Fleet and Heard., 1993; Mortimer and Polsinelli., 1999). These microorganisms, mainly yeasts and bacteria, will influence the organoleptic properties of the finished wine, with potentially a positive or negative impact. Molds and filamentous fungi, such as *Penicillium*, *Cladosporium* and *Aspergillus* genera (Goto et al., 1989), are also members of the microbiota in the vineyard and cellar environments; in the vineyard, they are often responsible for the reduction of crop yield and grape berry quality (Fournier et al 2013; Negri et al., 2017). In the cellar environment, microorganisms colonize surfaces and equipment that could be reservoirs for transfer of microbes from winery to wine fermentations (Connell et al., 2002; Garijo et al., 2008; Ocón et al., 2013a, 2013b; Bokulich et al., 2013). Air is also considered as a vector of dissemination due to water droplets and dust particles (Curiel et al., 2000) depending on factors such as temperature, humidity, particle size, air flows, human activity but also the architecture of the winery (Ocón et al., 2013a, 2013b). Indeed, *Saccharomyces* and other yeasts such as *Brettanomyces bruxellensis* have previously been identified from winery air samples (Connell et al., 2002). Microorganisms are also present on the surface of materials present in the cellar and are likely to be sources of contamination in contact with wine (Bokulich et al., 2013; Abdo et al., 2020). Molds are mainly found on floors and walls but also in oak barrels and can have an impact on the sensory qualities of wine such as the cork taint induced by the metabolism of chlorine compounds into trichloroanisole (Haas et al., 2010; Ciccarone et al., 2012). The presence of spoilage microorganisms on the surface of materials is particularly damaging in cases where *B. bruxellensis* is detected. Indeed, this yeast is considered the most problematic spoilage yeast in the cellar because of the production of volatile phenols characterized by stable, leather or solvent smells and organoleptic depreciation if curative actions are not carried out in time (Chatonnet et al., 1992, Lattey et al., 2010; Agnolucci et al., 2017). *B. bruxellensis* is known to be present in air (Beech., 1993; Connell et al., 2002) but also on surfaces such as floors, walls, vats room, winemaking equipment, pumps and pipes (Fugelsang., 1997; Cartwright et al., 2018; Oro et al., 2019; Abdo., 2020). This presence on the surface of different materials may be related to the bioadhesion properties of the species (Joseph et al., 2007; Lebleux et al., 2020). *B. bruxellensis* can bioadhere to materials such as stainless steel, wood, polystyrene and glass (Joseph et al., 2007, Oelofse et al., 2009; Tristezza et al., 2010; Kregiel

et al., 2018; Dimopoulou et al., 2019). Bioadhered cells can develop in the form of biofilm and thus persist in a poor and stressful environment. In this context, the objectives of our study are i) to diagnose the presence of *B. bruxellensis* in the cellar environment in different wineries from the Bordeaux region, ii) to characterize bioadhesion properties of *B. bruxellensis* isolates collected from cellar environment and iii) to evaluate the impact of *B. bruxellensis* biofilms on the wine quality. The final aim of our study is to better understand the origin of wine contamination by resident *B. bruxellensis* strains in the cellar.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling

The present study was conducted in 3 wineries in the Bordeaux region over a period from December 2021 to February 2022. The winery CH-1 is located in the Médoc appellation, the winery CH-2 in the Saint-Émilion appellation and the winery CH-3 in the Pessac-Léognan appellation. For wineries CH-1 et CH-3, samples were taken from empty tanks following the vinification process. For winery CH-2, samples were taken from empty tanks following the vinification process and from wooden tanks.

2.2. Aerocollection

The identification of microorganisms present in the cellar air was carried out on 250 liters of air collected by an aerocollector (AirTest®, LCB Food safety). The device was placed 1 meter high through a portable tripod in the center of the different sampling areas. The air was sucked and was impacted on Petri dishes with a diameter of 90 mm (Grosseron) containing selective agar media. The YPD medium composed of 2 % glucose (Fisher Bio-Reagent™), 2 % agar (Fisher Bio-Reagent™), 1% yeast extract (Fisher Bio-Reagent™) and 1% peptone (Fisher Bio-Reagent™) was supplemented with biphenyl (150 mg/L- Acros Organics) for fungal exclusion. To isolate total yeasts (TY), a YPD medium composed of 2 % glucose (Fisher Bio-Reagent™), 2 % agar (Fisher Bio-Reagent™), 1 % yeast extract (Fisher Bio-Reagent™) and 1 % peptone (Fisher Bio-Reagent™) supplemented with biphenyl (150 mg/L-Acros Organics) and chloramphenicol (150 mg/L-Fisher Chemical) was used. Finally, for specific *B. bruxellensis* isolation (YPD-Brett), the TY medium was supplemented with Actidione (500 mg/L-Thermo Scientific). The dishes once impacted by the air were placed at 25 °C for cultivation for 5 days for yeasts and molds and 8 days for *B. bruxellensis*. The results are then expressed in CFU/250L of air.

2.3. Surface sampling

Surface samplings were realized inside and on the bottom of the wooden, stainless steel, concrete tanks and the floor of the cellar. Samples were taken using contact dishes of diameter 65 mm (Grosseron) containing 18 mL of selective culture media poured into contact dishes to obtain a domed agar allowing application on flat surfaces, according to compositions described in part 2.2, for total yeast and *B. bruxellensis* specific counting. The application on the areas was carried out for 10 seconds by applying a light pressure on the box. The dishes were then incubated at 25 °C face up for 5 days for yeasts and 8 days for *B. bruxellensis*. Results are expressed in CFU/28 cm².

2.4. Swab

Swabbings were realized only on the CH-2 and CH-3 wineries on valves, tasting valves, inside of different tanks and different winery materials. The use of swabs was carried out to collect soiling in tight spaces. The swab was applied to the surface for 10 seconds and placed in a 4 mL of peptone buffer (Humeau) tube until cultured. The buffer was then diluted, inoculated on total yeast medium and YPD-Brett medium and incubated at 25 °C for 5 and 8 days, respectively. Results are expressed in CFU/mL.

2.5. Identification at species and strain levels

2.5.1. Identification at species level by MALDI-TOF MS

The identification of colonies isolated on YPD-Brett medium was performed using MALDI-TOF/MS on fresh colonies less than 10 days old using protein extraction and an oenological laboratory specific database as previously described by Windholtz et al (2021). The identification results were expressed as proposed by the manufacturer, with scores ranging from 0 to 3. Scores >2.3 indicate species identification, score values between 1.7 and 2.0 indicate genus identification, and a score <1.7 indicates unreliable identification.

2.5.2. Genetic analysis by microsatellite markers

DNA extraction was performed from fresh colonies less than 10 days old. The colonies were collected and lysed in 30 µL of NaOH at 20 mM for 10 min at 99 °C. The extracted DNA is then placed at -20 °C. Twelve pairs of primers previously described by Albertin et al (2014) and Avramova et al (2018) were used for the amplification of microsatellite markers (Table 1). In order to reduce the cost of the analyses and the number of PCR, some PCR reactions were

multiplexed according to their T_m and the fluorescent probe used (Table 7). The PCR reaction used is that described by Avramova *et al* (2018).

Table 7 Microsatellite markers used for genotyping

Microsatellite name	Motif	Primers	Fluorescent dyes	T _m , °C
B224	CTT/GCT	F: TGCAAGTTCTGCAGCGTT; R: ACCAACAACAGCAAAGACACG	FAM	53
B174	GAT	F: TGGTGCTTAGAGCAGATGATG R: GCAACTGTTCCAATGAATTCC	FAM	
D9b	ATG	F: TAATGAGAGAAGATGGAAAG R: TTGCACAACCTGTTTTTTCTA	FAM	53
B101	GAA/GAT	F: CACGCAAAGAAGATGAGGA R: TGCCATTCCTTATCCAAGTTG	HEX	56
B135c	CAA/AAC	F: ACATGCAAGACGTGCTCAAAG R: TGATCTCTTCCTGCAGCA	HEX	53
B122c	ATC	F: GAAAACGAGTTCGGAAGACT R: AAAAATTGAACGTGGTGATG	HEX	
D2	TGA/TGG	F: GCCATCATTGTGACTGTCGTT R: CATTGCTTTCCAACCTCTCA	AT550	56
B301	TTG/CTG	F: GTATGCTTGCGGGACTTGATT R: GCGACTTCAACAGCAGCTTAA	AT550	
D10b	TGC/TGT	F: CTCTGCATTGCTTACTTAGAC R: TTCCATTTATGATGGCAGGG	AT550	53
B273	TTA/ATT	F: CTGCAAGAAGATGAATTGGAA R: ACCTTTGGATTGGCCCTTT	AT565	53
B22	ATG	F: TTAGGTGGTTATCCGGAGGAG R: TATCCTCGTCAGCTTCTGCTT	AT565	56
D1	ACA	F: AGGAGGCTCCCGGAAATGT R: GTGCAAATTGGGGTGGAGA	AT565	

2.6. Bioadhesion property of the strains isolated from surface

Bioadhesion was performed in stainless steel after cleaning procedure explained in chapter 2. A unique isolate from microsatellites genetic profile CH-1 Profile 2, CH-3 Profile 3 and CH-3 Profile 4 were selected for bioadhesion tests. CH-1 Profile 2 isolate was not tested due to loss after subculturing. Few colonies were recovered on YPG medium and transferred to 10 mL of a mixture composed of 25 % (v/v) WLM medium which composition is described in chapter 2 and 75 % (v/v) YPD and incubated for 48 h (25 °C, 180 rpm). This adaptation step was repeated 3 times and the proportion of red wine was gradually increased (50 %, 75 % and finally 90 %). Bioadhesion protocol was performed according to the bioadhesion section of chapter 2. After the 3 h of bioadhesion, a coupon washing step was performed to remove the non-adherent cells that had sedimented. This step consists of 5 successive cleaning baths in a sterile container containing physiological water. The coupon was then placed in a solution of Chemsol B15 (Biomérieux) containing 1 % (v/v) of 5(6)-Carboxyfluorescein Diacetate (CFDA) (Thermo Fisher Scientific) at 8 mg/mL and 0.2 % (v/v) propidium iodide (PI) at 1 mg/mL in acetone (Thermo Fisher Scientific) with a standby time of 15 min. The surface of the coupon was observed by confocal microscopy within the Bordeaux Imaging Center Bordeaux Facilities of the INRAE plant pole, and observations were made using immersion lens. Confocal acquisitions were realized using a Zeiss LSM 880 confocal laser-scanning microscope with a diving 40× objective with a numerical aperture of 1. The excitation wavelengths and emission windows were respectively 488 nm/499–553 nm and 561 nm/588–688 nm for CFDA and propidium iodide; fluorochromes were detected sequentially line by line. The adhered cells were counted by the mean of 10 fields of vision counts.

2.7. Bioadhesion for phenols monitoring

2.7.1. Wine adaptation

For bioadhesion in wine, adaptation steps are necessary. Few colonies were recovered on YPG medium and transferred to 10 mL of a mixture composed of 25 % (v/v) red wine (Graves, 12.5 % vol., total SO₂ 23 mg/L, pH 3.7) and 75 % (v/v) grape juice, and incubated for 48 h (25 °C, 180 RPM). This adaptation step was repeated 3 times and the proportion of red wine was gradually increased (50 %, 75 % and finally 90 %).

2.7.2. Stainless steel bioadhesion and biofilm

Regarding bioadhesion, the cell culture was centrifuged for 5 min at 7000 g at room temperature and then the cell pellet was washed twice with physiological water (NaCl 0.9 %). The pellet was then resuspended in 20 mL of a 90 % wine and 10 % grape juice blend and adjusted to obtain a final concentration 10^7 cells/mL. The bioadhesion was carried out on 316L stainless steel coupons of dimensions 14 mm × 25 mm (Goodfellow). The coupons were cleaned according to the procedure described in Chapter 2. The rinsed coupons were placed in a 55 mm diameter Petri dishes containing 10 mL of cell suspension during 3 h at room temperature to initiate bioadhesion. Then a coupon washing step was performed to remove non-adherent cells on the surface of the coupon. This step consists of five successive cleaning baths in a sterile container containing physiological water. Once rinsed, coupons were placed in a vial added with 30 mL of red wine (Graves Appellation, 12.5 % vol., pH 3.7) and then placed at 20 °C until analysis. For each measurement point at 3 h, 2, 4, 6, 8, 14, 21 and 28 days, samples were prepared in triplicate. The red wine was initially analyzed for the presence of volatile phenols and *B. bruxellensis* contamination by enumeration on YPD-Brett medium.

2.7.3. Bioadhered cells quantification

The count of viable cells was performed by unhooking cells present on the surface of the coupon. The coupon was cleaned of the non-adherent cells by 5 successive washes in sterile physiological water (NaCl 0.9 %). The coupon was then placed in a 50 mL tube containing 10 mL of sterile physiological water (NaCl 0.9 %) and placed 2 minutes in sonication bath at 47 Hz. After this sonication step, the tube was shaken at maximum speed for 40 seconds. Serial dilutions were then carried out and 100 µL of the suspension were inoculated in triplicate on YPD agar medium. The result is then expressed in Colony Forming Unit per cm² (CFU/cm²).

2.7.4. Planktonic cells quantification

The quantification of free cells in the wine was carried out after the withdrawal of the coupon from the vial. The vial was shaken for a homogenization of the wine. Series of dilutions were then carried out and 100 µL of the suspension were inoculated in triplicate on YPD agar medium. The result is then expressed in Colony Forming Unit per milliliter (CFU/mL) of wine.

2.7.5. Biofilm thickness

The thickness measurement of the biofilm was carried out by observations in confocal microscopy. After the rinsing steps described in part 2.6, the coupon was then placed in a solution of Chemsol B15 (Biomérieux) containing 1 % (v/v) of 5(6)-carboxyfluoresceine

diacetate (CFDA) (Thermo Fisher Scientific) at 8 mg/mL and 0.2 % (v/v) propidium iodide (PI) at 1 mg/mL (Thermo Fisher Scientific) for 15 minutes. The surface of the coupon was observed by confocal microscopy within the Bordeaux Imaging Center facilities of the INRAE plant service. Observations were made using the immersion lens. Confocal acquisitions were made via a Zeiss LSM 880 (Zeiss) laser scanning confocal microscope with a dive objective of 40× and a numerical aperture of 1. The excitation wavelengths and emission windows were 488 nm/499–553 nm and 561 nm/588–688 nm, respectively, for CFDA and propidium iodide. Fluorochromes were detected sequentially line by line. The thickness measurement was carried out by taking successive images of each focal plane with the z-stack function of the ZEN microscopy software (Zeiss). The thickness analysis was then performed using the ROI manager function present on the FIJI image processing software extension of the ImageJ software.

2.8. Phenols quantification

The analysis of volatile phenols was performed on 10 mL of wine containing the coupon of bioadhered cells of *B. bruxellensis*. The wine was placed in a 25 mL vial containing 3.5 g of NaCl. An internal standard consisting of 4-ethylphenol deuterated was added to the wine at a concentration of 100 µg/L. The analysis was performed by gas chromatography equipped with an autosampler for solid phase microextraction (SPME) coupled to a quadrupole mass spectrometer (Romano et al., 2008). The SPME was made with an 85 µm polyacrylate fiber. The sample was injected in splitless mode into a column measuring 30 m x 0.25 mm. Helium was used as a carrier gas with a flow rate of 1 mL/min. The GC program that has been applied is as follows: 60 °C for 1 min then increase of 3 °C/min until reaching 125°C then increase of 5 °C/min to reach 220°C and finally 10 min at 220 °C. The electron impact mass detector performed in SIM mode (Selected Ion Monitoring). Volatile phenols were quantified by comparing peak areas of specific ions (4-vinylphenol m/z 120, 4-vinylguaiacol m/z 150, 4-ethylphenol m/z 107, 4-ethylguaiacol m/z 137) with that of deuterated 4-ethylphenol (m/z 113) used as the internal standard.

2.9. Statistical analysis

Kruskal-Wallis statistical test (R, p value < 0.05) were performed using R-package agricolae (Mendiburu, 2021)

3. Results

3.1. Detection of *B. bruxellensis* in the cellar environment

3.1.1. Aerocollection

Table 8 Detection and enumeration of microbes in the air of different cellars (*enumeration is indicated as the minimal and maximal colonies counts)

Winery	Appellation	Number of samples (n)	Aerocollection					
			YPD-Brett		Total Yeasts		Molds	
			Positive sample	Enumeration* (CFU/250L)	Positive sample	Enumeration* (CFU/250L)	Positive sample	Enumeration* (CFU/250L)
CH-1	Listrac-Médoc	2	2	1-8	2	1-4	2	203-251
CH-2	Saint-Émilion	4	0	/	4	3-17	4	76-216
CH-3	Pessac Léognan	4	1	1	3	0-5	4	20-34

The presence of microbes in the air was studied over a volume of 250L impacted on specific growth media. The results showed that molds are detected in 100% of samples but with differences according to the winery (Table 8). The CH-3 winery had the lowest mold enumeration of 20 to 34 CFU/250L of air compared to 203 to 251 CFU/250L of air for the CH-1 domain, which showed the highest mold concentrations. Nine upon ten air samples were positive for yeasts with the highest concentrations for the CH-2 winery. Colonies growing on YPD-Brett were detected in three upon ten samples and only in two wineries (CH-1 and CH-3). Finally, in the CH-3 winery, only one sample was positive for colonies in YPD-Brett (1 CFU/250L).

3.1.2. Surface sampling

Surface analyses were carried out on different winery materials such as barrels, stainless steel tanks, concrete vats and on cellar floor (Table 9). For the elements of the vat room, samples were taken from the bottoms of the vats as well as from the inner surfaces of the vats. 25 upon 47 surface samples have been positive to the presence of yeasts in proportions ranging from less than 1 to 36 CFU/cm². The highest number of yeast positive samples was found in the CH-2 winery (15 out of 20 samples) compared to 5 out of 11 and 5 out of 16 for the CH-3 and CH-1 wineries, respectively. Yeasts have been detected on all type of sampled surface materials, wood, stainless steel, concrete. The sampling area (bottom n=8 or inside n=8) significantly impacts on total yeast enumeration (0.05 < p-value).

Table 9 : Detection and enumeration of yeasts by surface sampling from various materials and different wineries (*enumeration is indicated as the minimal and maximal colonies counts)

Winery	Appellation	Surface	Sample areas	Number of samples (n)	Surface sampling			
					YPD-Brett		Total Yeasts	
					Positive sample	Enumeration* (CFU/cm ²)	Positive sample	Enumeration* (CFU/cm ²)
CH-1	Listrac-Médoc	Wooden tank	Bottom	8	5	<1-13	3	<1-2
			Inside	8	6	<1-13	2	<1-13
CH-2	Saint-Émilion	Stainless steel tank	Bottom	5	0	/	4	1-36
			Inside	5	0	/	4	1-36
		Wooden tank	Bottom	2	2	<1	2	11-15
			Inside	2	1	<1	2	11-15
		Cellar	Floor	6	2	<1	3	2-4
CH-3	Pessac-Léognan	Concrete tank	Bottom	5	1	<1	2	<1-5
			Inside	5	1	<1	2	<1-7
		Cellar	Floor	1	0	/	1	14

For YPD-Brett medium, 18 out of 47 samples were positive. The CH-1 winery has the highest number of positive samples (11 out of 16) compared to 2 out of 11 and 5 out of 20 for the CH-3 and CH-2 wineries, respectively. The CH-1 winery samples also have the highest cell concentration per cm² up to 13 CFU/cm² while for the CH-2 and CH-3 wineries samples, the number of colonies per sample was less than 1 CFU/cm² excepted in the cellar floor. The results showed that 14 wood surface samples out of 20 were positive for *B. bruxellensis*. As for total yeasts, sampling area seems not to impact the number of detected colonies (0.05 < p-value).

3.1.3. Swab

Swabs have been used to gain access to areas where sampling is difficult to spare tasting taps, wall angles, valves, in pumps, pipes and water recovery nozzles (Table 10). Yeasts have been detected in all sampled surfaces at population levels ranging from 60 CFU/swab to 1.6 x 10⁵ CFU/swab. In the CH-2 and CH-3 wineries, 25 out of 29 samples and 12 out of 17 samples were positive, respectively, for the presence of yeasts thus showing a low hygiene level in these areas difficult to clean.

Table 10 : Detection and enumeration of yeasts by swabbing in different wineries (*enumeration is indicated as the minimal and maximal colonies counts)

Winery	Appellation	Surface	Sample areas	Number of samples (n)	Surface sampling			
					YPD-Brett		Total Yeasts	
					Positive sample	Enumeration* (CFU/swab)	Positive sample	Enumeration* (CFU/swab)
CH-2	Saint-Émilion	Stainless steel tank	Valve	6	2	2-3	6	6,5x10 ² -1,2x10 ⁵
			Inside	6	2	1-4	2	4.7x10 ⁴ -9.1x10 ⁴
			Tasting valve	6	5	1-6	6	2.3x10 ⁴ -1.6x10 ⁵
		Wooden tank	Valve	1	0	/	1	60
			Inside	1	1	4	1	7.7x10 ³
			Tasting valve	1	0	/	1	1.0x10 ⁴
		Barrel	Floor	1	0	/	1	1.1x10 ⁵
		Materials	Pump	3	1	3	3	1.4x10 ⁴ -1.0x10 ⁵
			Pipe	1	1	1	1	7.1x10 ⁴
			Nozzle	3	2	1	3	1.6x10 ² -4.5x10 ²
CH-3	Pessac Léognan	Concrete tank	Valve	2	1	54	1	89
			Inside	3	2	9.4x10 ² -1.7x10 ³	2	3x10 ² -3.8x10 ²
			Tasting valve	2	2	1-7.6x10 ²	1	1.3x10 ²
		Barrel cellar	Floor	3	0	/	3	12-1.6x10 ²
		Materials	Pump	2	0	/	0	0
			Pipe	2	0	/	2	2-15
			Nozzle	3	0	/	3	32-2.5x10 ²

The detection of yeasts on YPD-Brett medium was possible on all the areas analyzed apart from the soil of the barrel cellars. The CH-2 winery samples showed a higher proportion of positive samples than the CH-3 winery with 14 out of 29 and 5 out of 17 positive samples, respectively. However, colonies enumeration per swab was relatively low for the CH-2 winery samples with a maximum of 6 CFU/swab compared to the CH-3 winery samples where colonies enumeration per swab was from 1x10² to 1.7x10³ CFU/swab in concrete vat. The swabs carried out on the concrete vats within the CH-3 winery correspond mainly to samples of tartaric acid precipitation which, once observed by optical microscopy, showed to be colonized by a high

number of yeasts including potentially *B. bruxellensis*. Samples taken from the winemaking equipment of the CH-3 winery showed no presence of *B. bruxellensis*.

3.1.4. Genetic analysis of the colonies isolated on YPD-Brett medium

The identification of colonies isolated from YPD-Brett medium using MALDI-TOF/MS confirmed that 98.1 % isolates belong to *B. bruxellensis* (Annexes 1). Colonies isolated on YPD-Brett medium for winery CH-1 (n=19) and CH-3 (n=8) were genotyped at strain level using microsatellite markers analysis.

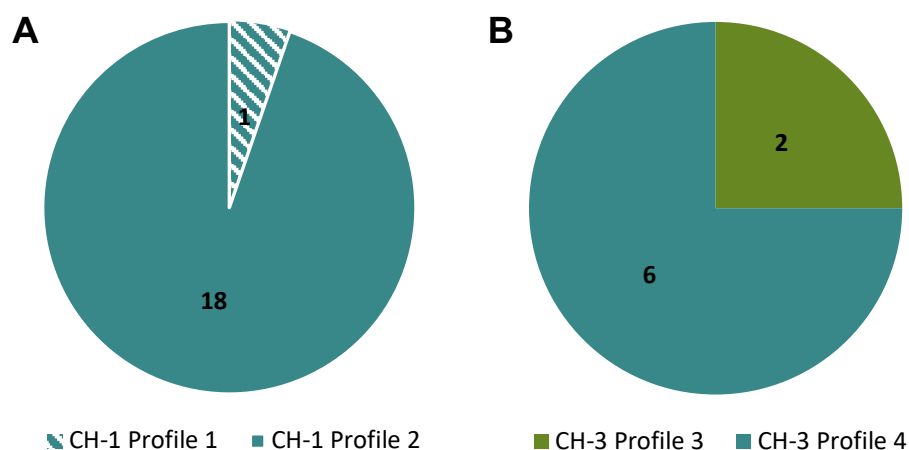


Figure 28 : Genetic profiles from each winery according to microsatellite markers (Albertin et al., 2014). The different colors represent the genetic group (Avramova et al., 2018). A represent the profiles of the winery CH-1, B represent the profiles of the winery CH-3

Regarding isolates within the CH-1 and CH-3 winery, 18 isolates out of 19 and 6 isolates out of 8, respectively, were showed to belong to the Wine 3 (CBS 2499) genetic group previously identified by Avramova (2018) (Fig. 28A). Two colonies of the CH-3 winery were showed to belong to the Kombucha genetic group (Fig. 28B). Isolates collected in the CH-1 (18 isolates out of the 19) showed the same genetic pattern thus suggesting that the cellar was colonized by a dominant strain (Fig 28A). Same result was obtained for 6 out of the 8 isolates for the CH-3 winery showing the same microsatellite genetic pattern.

3.1.5. Bioadhesion ability of *B. bruxellensis* strains collected from surfaces and equipment

Persistent microbial colonization of cellar environment could be related to specific ability to bioadhere and form biofilms of the microbial species. In this context, we examined the ability of *B. bruxellensis* strains isolated from surfaces and equipment to bioadhere on stainless steel coupons, in order to evaluate if this capacity could be higher than strains collected from spoiled wines.

Bioadhesion was observed for all strains after 3 hours. The higher bioadhesion capacity has been obtained for CH-1 Profile 2 with 1.4×10^4 cell/cm² followed CH-3 Profile 3 with 5.09×10^3 cell/cm². Finally, CH-3 Profile 4 have the lower bioadhesion property with 6.64×10^2 cell/cm². In the CH-3 winery, Profile 3 have significantly different bioadhesion properties than Profile 4 (p-value <0.05). The strains isolated from surfaces in wineries CH-1 and CH-3 do not show significant differences of bioadhesion capacities comparing with wine isolates of Wine 3 (n=10, mean 8.02×10^4 cell/cm²) and Kombucha (n=4, mean 8.54×10^3 cell/cm²) groups (chapter 2, p-value <0.05).

3.2. *B. bruxellensis* biofilm and volatile phenols production in wine

Till now, no study has shown that *B. bruxellensis* isolates present in biofilms could be at the origin of volatile phenols production in contact with wines. Three *B. bruxellensis* strains representative of the main genetic groups, Wine 3 (CBS 2499), Wine 1 (AWRI 1499) and Beer (AWRI1608) were selected to monitor their growth under biofilm and planktonic mode of life and their production of volatile phenols. After wine adaptation step, bioadhesion was carried out on stainless steel coupons after 3 hours at room temperature. Then rinsed coupons were placed in red wine and several parameters were monitoring for 28 days: concentration of bioadhered and planktonic cells in the wine, the thickness of the layer of bioadhered/biofilm cells and finally volatile phenols production. No *B. bruxellensis* were detected in the red wine and the initial volatile phenol concentration was below the analytical detection limit (3 µg/L).

3.2.1. Bioadhered and planktonic cells enumeration

The enumeration of bioadhered and planktonic cells was monitored every 48 hours for 8 days and then every 7 days until day 28 for the 3 strains of *B. bruxellensis* AWRI 1499, AWRI 1608, CBS 2499 after unhooking and by cell culture. Our results showed that, as expected, the initial concentration of bioadhered cells was different depending on the strain (Fig. 29A). Strains AWRI 1608 and CBS 2499 showed the highest counts of 10^6 cell/cm² on YPD medium compared to 10^3 cell/cm² for strain AWRI 1499. Then different dynamics of bioadhered cells were highlighted depending on the strain. A decrease in bioadhered cells level was observed for the 3 strains during the first 5 days. For strains AWRI 1608 and CBS 2499, this decrease was followed by a stationary phase between the 8th and 21st days and then a decrease on day 28 to reach 6.3×10^4 CFU/cm² and 5.14×10^3 CFU/cm², respectively. For AWRI 1499, the stationary phase was followed by an increase in bioadhered cells from day 14 to 28 to finally reach 1.24×10^3 CFU/cm².

Regarding cultivable planktonic cells in wine, a significant unhooking during the first 4 days was highlighted, the population level reached 3.3×10^2 CFU/mL, 1.43×10^4 CFU/mL and 7.6×10^4 CFU/mL for AWRI 1499, AWRI 1608 and CBS 2499, respectively (Fig. 29B). For AWRI 1608 and CBS 2499, this significant increase was followed by a stationary phase from day 6 to day 21 and a low decrease on day 28. The AWRI 1499 strain has a stationary phase between days 4 and day 8. From day 14, as for bioadhered cells, a significant increase in wine planktonic cells population was observed until the end of the monitoring, reaching the same final population levels of the strain AWRI 1608.

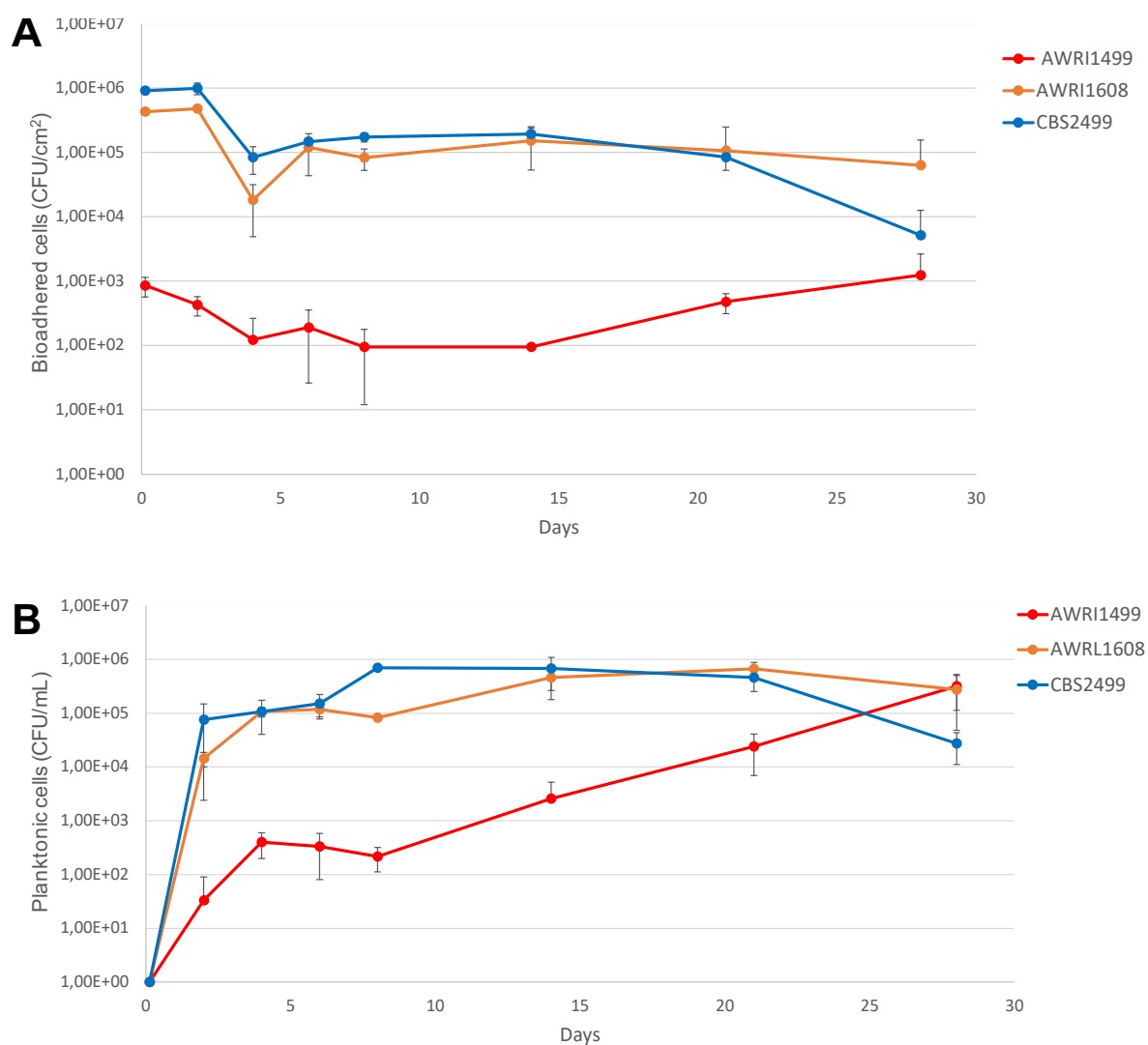


Figure 29 : Growth monitoring of *B. bruxellensis*. (A) Enumeration of bioadhered cells (B) and Planktonic cells (values are mean of 3 independent analysis)

3.2.2. Biofilm thickness

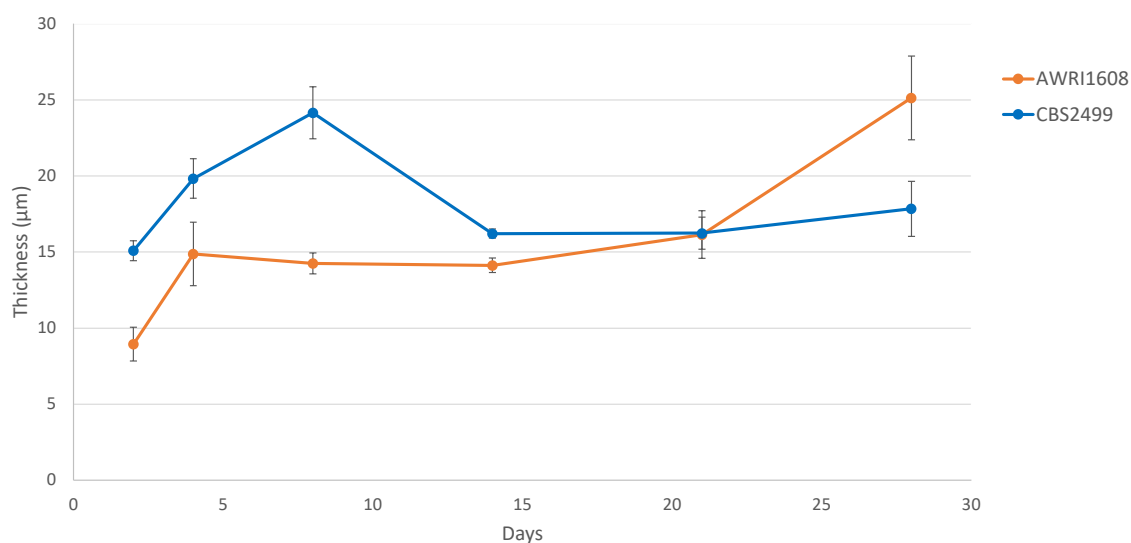


Figure 30 : Monitoring the thickness of bioadhered cells on stainless steel (values are mean of 3 independent analysis)

A monitoring of the biofilm cells layer thickness was carried out during the 28 days of the experiment. This monitoring could not be carried out on strain 1499 because it is not present homogeneously on the surface of the coupon. Therefore, this monitoring was carried out only on the strains AWRI 1608 and CBS 2499 (Fig. 30). AWRI 1608 biofilm was significantly thinner than CBS 2499 in the first 21 days but then a significant increase is observed on day 28 from 16 µm to 25 µm of thickness. Regarding strain CBS 2499, significant increase during the first 8 days in wine with a change from 15 µm to 24 µm was noticeable, then followed by a significant decrease between day 8 and day 14 and then stabilization until the end of monitoring.

3.2.3. Volatile phenols production

A monitoring of the production of volatile phenols by *B. bruxellensis* was carried out by quantifying ethyl and vinyl phenols by GC-MS. The production of volatile phenols by the 3 strains was below the detection limit during the first 2 days of monitoring. Detection was possible for strain CBS 2499 as early as day 4 while for AWRI strains 1608 and AWRI 1499 detection occurred on days 6 and 21, respectively (Fig. 31). The concentration of ethyl-phenols was significantly higher than that of vinyl phenols for strains AWRI 1608 and CBS 2499 while for strain AWRI 1499 the concentrations of the two volatile compounds were relatively similar. The detection threshold (420 µg/L) was reached for AWRI strains 1608 and CBS 2499 between days 8 and 14, whereas for AWRI 1499 it was never reached with the final maximum concentration of 273 µg/L on day 28. Concerning strains CBS 2499 and AWRI 1608, the final

concentrations were reached on the 21st and 28th day, respectively with 1432 $\mu\text{g/L}$ and 1485 $\mu\text{g/L}$.

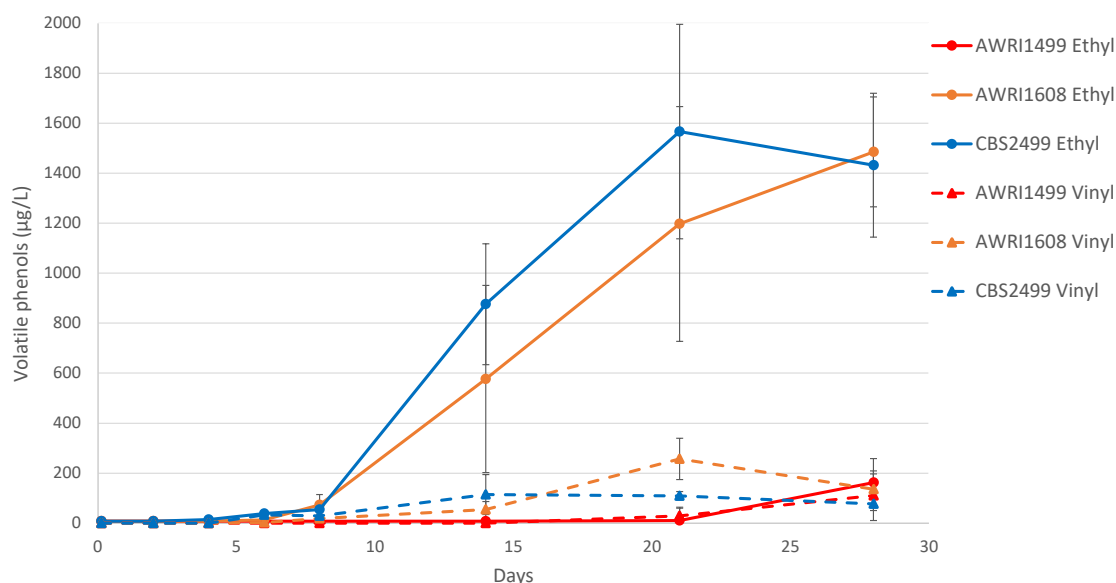


Figure 31 : Production of volatile phenols by *B. bruxellensis* (values are mean of 3 independent analysis)

4. Discussion

Microbial colonization in the winery environment was reported by different authors (Bokulich et al., 2013; Abdo et al., 2020). The persistence of microorganisms in cellars could be related to harborage sites difficult to clean and to disinfect or specific abilities to survive in the air or solid surfaces (Alvarez-Ordenez et al., 2019). *B. bruxellensis* species is one example of microbes having specific adaptation to colonize harsh environment such as wine and cellar (Smith and Divol, 2016). Moreover, recent study showed that the same *B. bruxellensis* genotype could be isolated repeatedly in wines from a given winery over decades, then demonstrating unsuspected persistence ability of *B. bruxellensis* that could be at the origin of recurrent wine spoilage (Cibrario et al., 2019). The aims of the present work were i) to identify specific critical areas for *B. bruxellensis* persistence in the winery and ii) to test if *B. bruxellensis* biofilms could be at the origin of volatile phenols production when in contact with wines.

4.1. Cellar air, vats and valves are critical areas for the presence of *B. bruxellensis*

Air is considered in many fields to be a vector for the dissemination of microorganisms and then contamination of different matrix due to the fluxes exerted (Bryan et al., 2019; Sanz et al., 2021). This phenomenon is also observed in the winery where the microorganisms that develop during the winemaking process can be identified in the air surrounding the vats and even the

cellar itself. Our results have shown the presence of molds and yeasts in the air, thus agreeing with numerous studies identifying these microorganisms as being present (Simeray et al., 2001; Mandl et al., 2010; Ocón et al., 2011; Perez-Martin et al., 2014). This presence depends on several environmental factors such as temperature, humidity, air flows and the sampling area that can explain the differences in population levels reported in previous studies (Ocón et al., 2013a, 2013b; Perez-Martin et al., 2014). Our data revealed that molds are present in all areas analyzed at significant population levels compared to the other microorganisms detected. Similar results have been observed showing higher proportions of molds than yeasts, although variations during the winemaking season (Garijo et al., 2008). However, the presence of large amounts of molds in the air can be detrimental to the organoleptic qualities of wines (Garijo et al., 2008). Some species of the genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Cladosporium* are responsible for the production of metabolites, such as trichloroanisole characterized by cork taint (Haas et al., 2010). Our study also showed the presence of yeasts in the air of all wineries with counts ranging from 1 CFU/250L to 17 CFU/250L of air depending on the zone and the winery considered. These concentrations are low but consistent with the period when the samples were taken, namely from the end of November to the end of January, following the high microbial activity during the winemaking period. Indeed, yeasts have been shown to be present at very high population levels in the air during the fermentation period (more than 180 MPN/cm³). Then a decrease is observed until low levels (less than 20 MPN/cm³) are reached, thus showing population level variations along the season (Ocón et al., 2013; Perez-Martin et al., 2014). In addition, temporal succession of yeasts species was reported with mainly *Saccharomyces cerevisiae* encountered in the air followed by non-*Saccharomyces* yeasts during the rest of the campaign (Ocón et al., 2010; Perez-Martin et al., 2014). This presence of yeast in the air can be of interest during spontaneous fermentation but also be damaging in the case of spoilage yeasts that could contaminate winery inert surface and/or wine. In the case of spoilage yeasts, our observations confirmed that *B. bruxellensis* is detected in cellar air (Beech., 1993; Connell et al., 2002). However, the presence of *B. bruxellensis* in the air is not confirmed for all the wineries studied and the number of colonies are low (1 to 8 CFU/250L). Several factors can influence the share of microbes in the air and the presence of wines contaminated with *B. bruxellensis* does not necessarily mean that these yeasts are also present in the air (Perez-Martin et al., 2014).

Surface samples analyses showed that yeasts are present on all winemaking material regardless of its composition (wood, stainless steel, concrete), thus showing significant capacities of microbes to colonize the winery environment. During the winemaking period, the cellar environment is saturated with yeasts mainly belonging to the species *S. cerevisiae* that can colonize the surfaces and thus persist in the cellar (Rosini., 1984, Ocón et al. 2010, Pretorius., 1999). Then, the proportion of *S. cerevisiae* decreases to give way to non-*Saccharomyces* yeasts such as *B. bruxellensis*. Our results showed that *B. bruxellensis* was detected in all wineries on the surface of materials such as wood, stainless steel and concrete. We showed for the first time the detection of *B. bruxellensis* on tartaric acid precipitation collected in concrete vat. These results are consistent with previous works showing that *B. bruxellensis* may be present on the surface of barrels and wine material (Fugelsang., 1997; Cartwright et al., 2018; Abdo., 2020). Swabs samples from hard-to-reach areas showed that these areas host large yeast population levels of up to 1.6×10^6 cells/swab, especially *B. bruxellensis*. Samples from valves showed concentrations up to 1.7×10^3 cell/swab. The presence of *B. bruxellensis* in valves had been previously reported (Oro et al. 2019). This presence can be explained by the fact that these areas are difficult to clean and that wine residues can accumulate there, thus facilitating the development of microorganisms.

The isolates collected in the present studies belong to Wine 3 and Kombucha genetic groups (Avramova et al. 2018). Genetic diversity of *B. bruxellensis* has already been studied on previous work showing up to 9 groups of clones in wine within the same winery (Cibrario et al. 2019). In the present work, our results showed that isolates collected from CH-1 and CH-3 winery have only two genetic patterns; this result suggest clonal expansion on wine material and equipment surfaces. At genetic level, Wine 3 group was identified as being the major one in the 2 wineries in connection with previous data on *B. bruxellensis* showing a prevalence of the Wine 3 group on the Bordeaux region (Cibrario et al., 2019).

All isolates collected in the present study can bioadhered on stainless steel. Compared to the results obtained for the wine strains of the Wine 1, Wine 3 and Kombucha groups, the strains isolated from surfaces do not show significant differences (p-value <0.05) in bioadhesion capacity thus reflecting a similar bioadhesion behavior between surface and wine isolates (Chapter 2).

4.2. *B. bruxellensis* biofilm in wine

The ability of three different *B. bruxellensis* strains to survive in a biofilm on stainless steel and to produce volatile phenols in wine was monitored for 128 days. Depending on the strain, the number of bioadhered cells was variable but with similar behaviors. We confirmed the higher ability of strains AWRI 1608 and CBS 2499 to bioadhere on stainless steel. Indeed, during the first days in contact with wine, the number of viable bioadhered cells decreases while that of planktonic cells increases for the three strains, suggesting a massive unhooking of the cells in the wine. However, during the same period, our results showed an increase in the thickness of the bioadhered cell layer suggesting that a significant portion of bioadhered cells have died or enter in a Viable But not Cultivable State (VBNC) but remain bioadhered serving as a carrier for other cells (Serpagi et al., 2012; Lebleux et al., 2020). This phenomenon has already been observed during growth kinetics in *B. bruxellensis* biofilm in wine (Lebleux et al., 2020). After 8 days in wine, the average thicknesses observed in our conditions were of the order of 14.25 μm to 24.15 μm for the 2 strains present in the form of a homogeneous layer. This thickness appears to be higher than those observed in previous work on *B. bruxellensis* after 7 days in wine (mean thickness 9.45 μm) (Lebleux et al., 2020). However, the wine composition in and the strains studied were different and could, at least partially, explain these variations in thicknesses. In addition, the thickness of the biofilm in *B. bruxellensis* remains low compared to other yeasts such as *Candida albicans* which show a thickness between 8 and 84 μm and *Saccharomyces cerevisiae* a thickness of 25-30 μm (Daniels et al., 2013; Bojsen et al., 2014).

From an oenological point of view, the impact of bioadhered *B. bruxellensis* on stainless steel on wine has been studied. Cells can detach from the biofilm and contaminate the wine with production of volatile phenols. Our result is consistent with the work carried out by Lebleux (2022). In our conditions, the proper production of volatile phenols by bioadhered cells was not determine due to the presence of planktonic cells in high concentrations. However, results showed variable production kinetics depending on the *B. bruxellensis* strain. This production kinetics are directly related to nutrient assimilation and yeast growth, which may differ depending on the strain (Longin et al., 2016; Cibrario et al., 2020). In order to determine the proportion of volatile phenols produced by bioadhered cells, further method development is needed to study the direct impact of bioadhered cells on the production of these volatile compounds.

5. Conclusion

Our study highlights the diversity of fungal microorganisms present in the cellar environment with differences according to the winery, thus showing that each cellar is made up of its own microbial environment. *B. bruxellensis* was detected both in the air and surface of different materials in cellar, including tartaric acid precipitation. The presence of bioadhered cells could be a source of wine contamination with potential serious negative impact on organoleptic qualities of wine. Moreover, planktonic cells can be released in wine from biofilm, initiate a growth and are able to produce volatile phenols. Our study provides new data on the origin of wine spoilage by resident population of *B. bruxellensis* in biofilm formation and confirms the special attention that must be paid to the hygiene of hard-to-reach areas such as the valves.

References

- Abdo, H., 2020. Biodiversité fongique dans une nouvelle cuverie et dynamique des populations en cuverie (*Saccharomyces cerevisiae*) et en cave d'élevage (*Brettanomyces bruxellensis*). Université de Bourgogne Franche-Comté.
- Abdo, H., Catacchio, C.R., Ventura, M., D'Addabbo, P., Alexandre, H., Guilloux-Bénatier, M., Rousseaux, S., 2020. The establishment of a fungal consortium in a new winery. *Sci Rep* 10, 7962. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64819-2>
- Agnolucci, M., Tirelli, A., Cocolin, L., Toffanin, A., 2017. *Brettanomyces bruxellensis* yeasts: impact on wine and winemaking. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2345-z>
- 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>
- 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, 173–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121805>
- 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., 2018. *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>
- Beech, F.W., 1993. Yeasts in cider-making. *The yeasts*, Academic Press 169–213.
- 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>
- Bokulich, N.A., Ohta, M., Richardson, P.M., Mills, D.A., 2013. Monitoring Seasonal Changes in Winery-Resident Microbiota. *PLOS ONE* 8, e66437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066437>
- Bryan, N.C., Christner, B.C., Guzik, T.G., Granger, D.J., Stewart, M.F., 2019. Abundance and survival of microbial aerosols in the troposphere and stratosphere. *ISME J* 13, 2789–2799. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0474-0>
- Cartwright, Z.M., Glawe, D.A., Edwards, C.G., 2018. Reduction of *Brettanomyces bruxellensis* Populations from Oak Barrel Staves Using Steam. *Am J Enol Vitic.* 69, 400–409. <https://doi.org/10.5344/ajev.2018.18024>
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J. -n., Pons, M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60, 165–178. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740600205>
- Cibrario, A., Avramova, M., Dimopoulou, M., Magani, M., Miot-Sertier, C., Mas, A., Portillo, M.C., Ballestra, P., Albertin, W., Masneuf-Pomarede, I., Dols-Lafargue, M., 2019. *Brettanomyces bruxellensis* wine isolates show high geographical dispersal and long persistence in cellars. *PLOS ONE* 14, e0222749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222749>
- Cibrario, A., Perello, M.C., Miot-Sertier, C., Riquier, L., de Revel, G., Ballestra, P., Dols-Lafargue, M., 2020. Carbohydrate composition of red wines during early aging and incidence on spoilage by *Brettanomyces bruxellensis*. *Food Microbiology* 92, 103577. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103577>
- Ciccarone, C., Petrucci, L., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., 2012. Qualitative survey of fungi isolated from wine-aging environment: Fungi from wine-aging. *International Journal of Food Science & Technology* 47, 1138–1143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02952.x>
- Connell, L., Stender, H., Edwards, C.G., 2002. Rapid Detection and Identification of *Brettanomyces* from Winery Air Samples Based on Peptide Nucleic Acid Analysis. *Am J Enol Vitic.* 53, 322–324.

- Curiel, G.J., Van Eijk, H.J.M., Lelieveld, H.L.M., 2000. Risk and control of airborne contamination. Encyclopedia of food microbiology, Academic Press London 1816–1822.
- 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>
- Dimopoulou, M., Renault, M., Dols-Lafargue, M., Albertin, W., Herry, J.-M., Bellon-Fontaine, M.-N., Masneuf-Pomarede, I., 2019. Microbiological, biochemical, physicochemical surface properties and biofilm forming ability of *Brettanomyces bruxellensis*. Annals of Microbiology 69, 1217–1225. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01503-5>
- Fleet, G.H., 1993. Wine Microbiology and Biotechnology. CRC Press.
- Fournier, E., Gladieux, P., Giraud, T., 2013. The ‘Dr Jekyll and Mr Hyde fungus’: noble rot versus gray mold symptoms of *Botrytis cinerea* on grapes. Evol Appl 6, 960–969. <https://doi.org/10.1111/eva.12079>
- Fugelsang, K.C., 1997. Wine Microbiology. Springer US, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6970-8>
- 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, 141–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.014>
- Goto, S., Takayama, K., Shinohara, T., 1989. Occurrence of molds in wine storage cellars. Journal of Fermentation and Bioengineering 68, 230–232. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(89\)90020-2](https://doi.org/10.1016/0922-338X(89)90020-2)
- Haas, D., Galler, H., Habib, J., Melkes, A., Schlacher, R., Buzina, W., Friedl, H., Marth, E., Reinthaler, F.F., 2010. Concentrations of viable airborne fungal spores and trichloroanisole in wine cellars. International Journal of Food Microbiology, The 16th CBL (Club des Bactéries Lactiques) Symposium, May 2009, Toulouse, France 144, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.008>
- 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.
- Kregiel, D., James, S.A., Rygala, A., Berlowska, 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>

- Lattey, K. a., Bramley, B. r., Francis, I. l., 2010. Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16, 189–202. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00069.x>
- Lebleux, M., Abdo, H., Coelho, C., Basmaciyan, L., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Roullier-Gall, C., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., Weidmann, S., Rousseaux, S., 2020. New advances on the *Brettanomyces bruxellensis* biofilm mode of life. *International Journal of Food Microbiology* 318. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108464>
- 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>
- Mandl, K., Schattauer, D., Geyrhofer, A., Weingartmann, H., 2010. Biodiversity of fungal microflora in wine-cellars. *Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Fruchteverwertung* 60, 350–354.
- Mendiburu, F. de, 2021. *agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*.
- Mortimer, R., Polsinelli, M., 1999. On the origins of wine yeast. *Res Microbiol* 150, 199–204. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(99\)80036-9](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(99)80036-9)
- Negri, S., Lovato, A., Boscaini, F., Salvetti, E., Torriani, S., Commisso, M., Danzi, R., Ugliano, M., Polverari, A., Tornielli, G.B., Guzzo, F., 2017. The Induction of Noble Rot (*Botrytis cinerea*) Infection during Postharvest Withering Changes the Metabolome of Grapevine Berries (*Vitis vinifera* L., cv. *Garganega*). *Frontiers in Plant Science* 8.
- Ocón, E., Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Olarte, C., Gutiérrez, A.R., Sanz, S., 2013a. Comparison of culture media for the recovery of airborne yeast in wineries. *Lett Appl Microbiol* 57, 241–248. <https://doi.org/10.1111/lam.12103>
- Ocón, E., Garijo, P., Sanz, S., Olarte, C., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R., 2013b. Analysis of airborne yeast in one winery over a period of one year. *Food Control* 30, 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 Microbiol* 27, 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, M169–M174. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02097.x>
- Oelofse, A., Lonvaud-Funel, A., du Toit, M., 2009. Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiol* 26, 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.10.011>
- 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.
- 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>
- Pretorius, I.S., Van der Westhuizen, T.J., Augustyn, O.P.H., 1999. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African Wine Industry. A review. *South African Journal of Enology and Viticulture (South Africa)*.
- Romano, A., Perello, M.C., Revel, G. de, Lonvaud-Funel, A., 2008. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1577–1585. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03693.x>
- Rosini, G., 1984. Assessment of dominance of added yeast in wine fermentation and origine of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 30, 249–256. <https://doi.org/10.2323/jgam.30.249>
- Sanz, S., Olarte, C., Hidalgo-Sanz, R., Ruiz-Ripa, L., Fernández-Fernández, R., García-Vela, S., Martínez-Álvarez, S., Torres, C., 2021. Airborne Dissemination of Bacteria (*Enterococci*, *Staphylococci* and *Enterobacteriaceae*) in a Modern Broiler Farm and Its Environment. *Animals* 11, 1783. <https://doi.org/10.3390/ani11061783>
- Simeray, J., Mandin, D., Mercier, M., Chaumont, J.-P., 2001. Survey of viable airborne fungal propagules in French wine cellars. *Aerobiologia* 17, 19–24. <https://doi.org/10.1023/A:1007686116283>
- 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>

- Stefanini, I., Dapporto, L., Legras, J.-L., Calabretta, A., Di Paola, M., De Filippo, C., Viola, R., Capretti, P., Polsinelli, M., Turillazzi, S., Cavalieri, D., 2012. Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 13398–13403. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208362109>
- 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>
- Windholtz, S., Dutilh, L., Lucas, M., Maupeu, J., Vallet-Courbin, A., Farris, L., Coulon, J., Masneuf-Pomarède, I., 2021. Population dynamics and yeast diversity in early winemaking stages without sulfites revealed by three complementary approaches. *Applied Sciences (Switzerland)* 11. <https://doi.org/10.3390/app11062494>

Chapitre 5 : Impact de différents matériaux
sur les propriétés de bioadhésion de
Brettanomyces bruxellensis

Dans cette dernière partie, l'impact du matériau sur les propriétés de bioadhésion a été exploré ; pour ce faire différents matériaux œnologiques ont été utilisés ainsi que différents polymères présentant des propriétés antibiofilms dans le domaine maritime.

Impact de différents matériaux sur les propriétés de bioadhésion de *Brettanomyces bruxellensis*

1. Introduction

Les microorganismes présents sur Terre adoptent dans 80% des cas un mode de vie sous forme de biofilm du fait des avantages qui y sont associés (Richards and Melander., 2009 ; Flemming and Wuertz., 2019). En effet, sous cette forme, les microorganismes présentent une plus forte tolérance aux agressions exercées par l'environnement dans lequel ils se trouvent comme la dessiccation, les actions chimiques, la chaleur et les traitements antibiotiques (Tamuru et al., 2006 ; Cepas et al., 2019 ; Abebe., 2020 ; Stanford et al., 2021). Cette tolérance est majoritairement due à la matrice extracellulaire du biofilm qui agit comme une barrière de protection entre les cellules et l'environnement. Cependant cette tolérance aux contraintes environnementales induit, dans différents domaines comme le médical, l'agroalimentaire et le transport maritime, des problèmes en lien avec la persistance de ces microorganismes sous forme de biofilm (Piola et al., 2009 ; Kaye et al., 2019 ; Zara et al., 2020). La croissance sous forme de biofilm est dépendante du matériau servant de support pour la bioadhésion du fait des propriétés de surface qui lui sont propres. En effet, plusieurs facteurs comme l'énergie libre de surface et l'hydrophobicité peuvent affecter la bioadhésion d'un microorganisme sur un support (Callow and Fletcher., 1994 ; Finlay et al., 2002 ; Genin et al., 2014 ; Gross et al., 2016). La rugosité est également un paramètre à prendre en compte pouvant avoir un impact sur la bioadhésion (Krsmanovic et al., 2021 ; Yang et al., 2022). Une rugosité importante faciliterait la bioadhésion des microorganismes. Cependant, cet observation semble être dépendant du matériau et de l'espèce microbienne étudiée ; ainsi il a été montré pour certains microorganismes que la rugosité n'impactait pas la bioadhésion de manière significative (Boulangé-Petermann et al., 2009 ; Medilanski et al., 2002). Afin de réduire les risques de bioadhésion, des polymères présentant des propriétés antifouling ont été développés pour inhiber les phénomènes de bioadhésion (Ma et al., 2017 ; Asha et al., 2022). Cependant ces polymères sont dans la majorité des cas toxiques étant donné leur origine pétrochimique ce qui pose problème dans le cadre de la transition écologique actuelle. Une alternative aux polymères pétrosourcés est l'utilisation de polymères de type poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA) biosourcés et biodégradables ayant pour origine des microorganismes. Ces polymères associés à d'autres

molécules comme du Polyéthylène glycol (PEG) présentent des propriétés antifouling similaires à celles des polymères pétrosourcés (Manecka et al., 2014 ; Guennec et al., 2021).

Dans la filière vitivinicole, différents matériaux ont été utilisés au fil des siècles pour la vinification, la conservation et le transport du vin : la terre cuite et la céramique, puis le bois et le béton. Les cuves en béton doivent être affranchies avec une solution d'acide tartrique à 10-20% pour éviter le contact direct du vin. Une autre solution consiste à les enduire avec une résine époxy limitant ainsi l'aspect poreux du matériau plus facilement nettoyable (Desenne et al., 2008). De nos jours, l'acier inoxydable est utilisé massivement du fait de sa résistance à la corrosion induite par l'utilisation de sulfites (SO₂) mais également de ses facilités de nettoyage (Valdez et al., 2015). Ces différents matériaux peuvent héberger un grand nombre de microorganismes à leur surface.

Les microorganismes retrouvés au cours de la vinification sont principalement des levures et des bactéries qui participent à la fois de manières positives et négatives à l'élaboration du vin (Bokulich et al., 2013 ; Varela et al., 2021). La présence de microorganismes d'altération est synonyme d'un certain nombre de déviations comme la reprise de fermentation en bouteille, l'augmentation de la turbidité et du trouble dans les vins, la présence d'un film à la surface du vin mais surtout la présence de composés d'altération qui déprécient les caractéristiques sensorielles des vins (Zuehlke et al., 2013 ; Branco et al., 2020 ; Perpetuini et al., 2021). *Brettanomyces bruxellensis* est considérée comme étant la levure d'altération la plus impactante du fait de la production de phénols volatils qui évoquent des odeurs d'écurie, de sueur de cheval et de cuir provoquant une dépréciation organoleptique du vin contaminé (Chatonnet et al., 1992 ; Lattey et al., 2010 ; Agnolucci et al., 2007). Cette levure est retrouvée dans l'ensemble de l'environnement du chai (Fugelsang., 1997 ; Connell et al., 2002) du fait de capacités de bioadhésion et de formation de biofilm importante pour l'espèce (Joseph et al., 2007 ; Dimopoulou et al., 2019). Jusqu'à présent, la capacité de *B. bruxellensis* à bioadhérer et de former des biofilms a été étudiée sur du verre, du polystyrène et de l'acier inoxydable (316L). Cette espèce a également été décrite à la surface du bois (Renouf et al., 2006). Dans les précédents chapitres, les propriétés de bioadhésion de *B. bruxellensis* ont été évaluées uniquement sur acier inoxydable (316L). Aussi, l'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact de différents matériaux, de leur rugosité et de différents polymères antifouling sur les propriétés de bioadhésion de *B. bruxellensis*.

2. Matériels et méthodes

2.1. Souches et croissance cellulaire

Dans le cadre de cette étude, 6 souches de *B. bruxellensis* présentant des capacités de bioadhésion contrastées ont été utilisées (Tableau 11). Ces souches ont été isolés principalement à partir de vins rouges et font partie de la collection AWRI (Australian Wine Research Institute, Adélaïde, Australie), de la collection YJS (Laboratoire de Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie, Université de Strasbourg) et de la collection CBS-KNAW (Fungal Biodiversity Center, Utrecht, Pays-Bas). Les souches de *B. bruxellensis* ont été conservées à -80 °C dans un mélange de YPG 70 % comprenant 2 % (p/v) de glucose (Fisher Bio-Reagent™), 1 % (p/v) d'extrait de levure (Fisher BioReagent™), 1 % (p/v) de peptone (Gibco) et 30 % de glycérol (v/v) avant d'être cultivées sur un milieu solide YPG (gélose Fisher BioReagent™ à 2 % (p/v)) puis incubées pendant 5 jours à 25 °C.

Tableau 11 : Liste des souches *B. bruxellensis* utilisées pour cette étude en fonction de leur groupe génétique et substrat d'origine (*Avramova et al., 2018).

Souche	Groupe génétique*	Substrat
AWRI1608	Beer	Vin rouge
CBS2499	Wine 3	Vin rouge
YJS7820	Teq/EtOH	Bière
YJS8202	Wine 1	Vin rouge
YJS8357	Wine 1	Vin rouge
YJS8528	Wine 3	Vin rouge

2.2. Adaptation au milieu WLM

Le milieu standard appelé Wine Like Medium (WLM) a été utilisé pour le phénotypage (Chapitre 2). Ce milieu a été choisi du fait que les phénotypes étudiés ont montré des réponses similaires à celles obtenues sur matrice vin (Le Montagner et al., 2023). Le milieu WLM est composé de 0,05 % (p/v) de glucose (Fisher Bio- Reagent™), 0,15 % (p/v) de fructose (Sigma Aldrich), 0,2 % (p/v) d'acide tartrique (Prolabo), 0,05 % (p/v) d'acide citrique (Prolabo), 0,03 % (p/v) d'acide malique (Aldrich Chemistry), 0,25 % (p/v) d'extrait de levure (Fisher Bio-Reagent™), 0,5 % (p/v) de glycérol (Sigma Aldrich®) et 10 % (v/v) d'éthanol (VWR Chemicals®). Le pH a été ajusté à 3,6 avec de l'hydroxyde de potassium. Des étapes de

préculture sont nécessaires afin d'adapter les levures au milieu WLM. Quelques colonies sont récupérées sur milieu gélosé et transférées dans 10 mL d'un mélange composé de 25 % (v/v) de milieu WLM et de 75 % (v/v) de milieu YPG liquide (2 % (p/v) de glucose, 1 % (p/v) d'extrait de levure et 1 % (p/v) de peptone) pour 48 h d'incubation à 25 °C sous agitation à 180 rpm. Cette étape d'adaptation est répétée 3 fois et la proportion de WLM est progressivement augmentée (50 %, 75 % et enfin 90 %). Après 48 h d'incubation (25 °C, 180 RPM), la culture cellulaire est prélevée pour l'analyse des propriétés de bioadhésion.

2.3. Propriété physico-chimique des matériaux.

L'étude est réalisée sur 3 matériaux rencontrés fréquemment en œnologie et dont les surfaces sont identiques d'un coupon à l'autre. Ainsi, un acier inoxydable 316L lisse (SSS) (Goodfellow), un acier inoxydable 316 brossé (RSS) (Goodfellow) et de la résine époxy agroalimentaire industrielle Forepox G355 (Bouchillou alkya) ont été utilisés pour les essais de bioadhésion.

2.3.1. Procédure de nettoyage des matériaux

Pour les 2 références d'acier inoxydable, les coupons sont placés durant 5 min dans un mélange d'éthanol et d'acétone (50/50) afin de retirer les dépôts d'adhésifs. Les coupons sont ensuite placés durant 5 min dans de l'éthanol 70 % dans le but de les désinfecter, puis rincés avec de l'eau distillée et séchés avec du papier optique. Les coupons de résine époxy sont placés durant 5 min dans de l'éthanol 70 % dans le but de les désinfecter puis rincés durant 5 min dans le but de désinfecter les coupons.

2.3.2. Mouillabilité des matériaux

Une fois les matériaux nettoyés, ils sont immergés durant 3h à température ambiante dans du milieu WLM puis rincés une fois avec de l'eau distillée et séchés sous hôte à flux laminaire durant 1h. Les mesures d'angle de contact (θ) ont été réalisées en utilisant la méthode de la goutte sessile. Une goutte d'un liquide test a été déposée à la surface du matériau et l'angle de contact a été mesurée en utilisant un goniomètre DSA 100 (KRUSS). Les mesures sont réalisées en triplicata pour chaque matériau et des mesures d'angle de contact sont effectuées sur au moins huit positions par coupon.

2.3.3. Énergie libre de surface

L'énergie libre de surface est déterminée pour chaque matériau en mesurant l'angle de contact (θ) de l'eau (eau ultrapure) et du diiodométhane (Sigma) par le biais de la goutte sessile combiné à l'équation de Young-Owens et Wendt décrite dans le chapitre 2.

2.4. Bioadhésion

2.4.1. Support de bioadhésion

La culture cellulaire obtenue après 48 h de croissance dans du WLM 90 % est centrifugée pendant 5 min à 7000 g à température ambiante puis le culot cellulaire a été lavée deux fois avec de l'eau physiologique (NaCl 0,9 %). Le culot est ensuite remis en suspension dans 20 mL d'un mélange WLM à 90 % et YPG 10 % et la suspension cellulaire est ajusté pour obtenir une population finale de 10^7 cellules/mL. La bioadhésion a été réalisée sur des coupons des 3 matériaux différents, sur acier inoxydable 316L poli (SSS) de dimension 14 mm \times 25 mm (Goodfellow), sur acier inoxydable 316L non-poli (RSS) de dimension 14 mm \times 25 mm et sur résine époxy Forepox GE55 (Bouchillou alkya). Les coupons sont nettoyés conformément à la procédure décrite en partie 2.3.1. Les coupons rincés sont placés dans des boîtes de Petri d'un diamètre de 55 mm et 10 mL de suspension cellulaire sont ensuite ajoutés aux boîtes de Petri pour initier la bioadhésion pendant 3 h à température ambiante.

2.4.2. Polymère antibiofilm

Des tests de bioadhésion ont été réalisés sur des coupons d'acier inoxydable recouvert de six polymères antibiofilms différents utilisés dans l'industrie maritime : le poly[(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalérate)] (PHBHV) contenant 30 mol de 3-hydroxyvalérate (Pacific Biotech, Tahiti, Polynésie française), le PHAmcl (PHA medium-chain-length) (fourni par l'Ifremer), le Poly[(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyhexanoate)] (PHBHHx) avec 20 mol de HHx (fourni par CHEN Georges, Université de Tshingua, Chine), le copolymère PHBHHx-PEG (Guenec et al. 2021), le polydiméthylsiloxane (PDMS) (Momentive Performance Materials, France, sous la marque RTV-615), le copolymère PDMS-PEG (nom commercial CoatOsil 7602, Momentive Performance Materials, France). Ce copolymère a une masse molaire d'environ 3000 g/mol et présente une structure greffée. De plus, il contient 20 à 50 unités OE par chaîne de PDMS (Gillet et al., 2018). Avant bioadhésion, les coupons sont stérilisés sous lumière UV durant 15 min puis placés dans des boîtes de Petri d'un diamètre de 55 mm. La suspension cellulaire (10 mL) est ensuite ajoutée aux boîtes de Petri pour initier la bioadhésion pendant 3 h à température ambiante

2.4.3. Microscopie confocale

La quantification de la bioadhésion est réalisée par microscopie confocale au sein de la plateforme Bordeaux Imaging Center Bordeaux du pôle végétal INRAE. Après les 3h de bioadhésion, une étape de lavage du coupon est effectuée afin d'éliminer les cellules non adhérentes qui ont sédimentées. Cette étape consiste en 5 bains de nettoyage successifs dans un récipient stérile contenant de l'eau physiologique. Le coupon est ensuite placé dans une solution de Chemsol B15 (Biomérieux) contenant 1 % (v/v) de 5(6)-carboxyfluorescéine diacétate (CFDA) (Thermo Fisher Scientific) à 8 mg/mL et 0,2 % (v/v) d'iodure de propidium (IP) à 1 mg/mL (Thermo Fisher Scientific) avec un temps de coloration de 15 min. Les observations de la surface du coupon sont réalisées par microscopie confocale à l'aide d'un objectif à immersion. Les acquisitions confocales sont réalisées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser Zeiss LSM 880 avec un objectif de plongée de x40 et une ouverture numérique de 1. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission étaient respectivement de 488 nm/499–553 nm et de 561 nm/588–688 nm pour le CFDA et l'iodure de propidium. Les fluorochromes sont détectés séquentiellement. La concentration en cellules bioadhérées est déterminée par un calcul de la moyenne de 10 champs de d'observation.

3. Résultats

3.1. Propriétés physico-chimique de surface des matériaux

La mesure de la mouillabilité des différents matériaux a été réalisée après nettoyage des coupons et après 3 h d'immersion dans du WLM. Les valeurs d'angle de contact et d'énergie libre de surface sont représentées dans le tableau 12. Après nettoyage, les 2 références d'inox SSS et RSS ont montré des angles de contact respectif de 104,3° et 105° montrant ainsi une non-mouillabilité et donc un comportement hydrophobe avec une composante polaire réduite (0,01 mJ.M⁻² et 0,2 mJ.M⁻²). L'angle de contact mesuré pour la résine époxy après lavage est de 79,2° indiquant un comportement hydrophile et une polarité faible (4,7 mJ.M⁻²).

Après un contact avec du milieu WLM, une diminution de l'angle de contact de l'eau est observée pour les 2 références d'acier inoxydable passant ainsi de 104,3° à 67° et de 105° à 64,8° pour SSS et RSS, respectivement indiquant une hydrophilisation et des comportements similaires pour les deux matériaux. Une augmentation de la polarité est également observée passant respectivement pour SSS et RSS de 0,01 mJ.M⁻² à 9,9 mJ.M⁻² et de 0,2 mJ.M⁻² à 15,6 mJ.M⁻². Après immersion dans le milieu WLM, une hydrophilisation importante est également observée pour la résine époxy passant de 79,2° à 50°. Une forte augmentation de la polarité est

également été observée passant de $4,7 \text{ mJ.M}^{-2}$ à $20,2 \text{ mJ.M}^{-2}$. Ainsi les 2 références d'acier inoxydables montrent des propriétés de surface similaires hydrophobes et peu polaires avant immersion dans le milieu WLM. Le milieu WLM montre une action hydrophilisante sur l'acier inoxydable. La résine époxy possède des propriétés de surfaces différentes de l'acier inoxydable avec un comportement hydrophile et polaire accentué en présence de WLM.

Tableau 12 : Mesures des angles de contact et d'énergie libre de surface de différents matériaux œnologiques. γS^D représente les composantes Dispersive-Lifshitz-van der Waals, γS^P représente la composante polaire et γS représente l'énergie libre totale. Les mesures ont été réalisées en triplicata pour chaque matériau et des mesures d'angle de contact ont été effectuées sur au moins huit positions par coupon (valeurs moyennes)

Matériau	Condition	Angle de contact (θ)		Energie libre de surface (mJ.m^{-2})		
		Eau	Diiodométhane	γS^D	γS^P	γS
SSS	Après lavage	104,3	46,7	36,1	0,01	36,1
	Après lavage et immersion dans WLM	67	46,1	36,4	9,9	46,3
RSS	Après lavage	105	64,5	26	0,2	26,2
	Après lavage et immersion dans WLM	64,8	64,8	25,8	15,6	41,4
Résine époxy	Après lavage	79,2	48	35,4	4,7	40,1
	Après lavage et immersion dans WLM	50	48,4	35,2	20,2	55,4

3.2. Effet du type de matériaux sur la bioadhésion

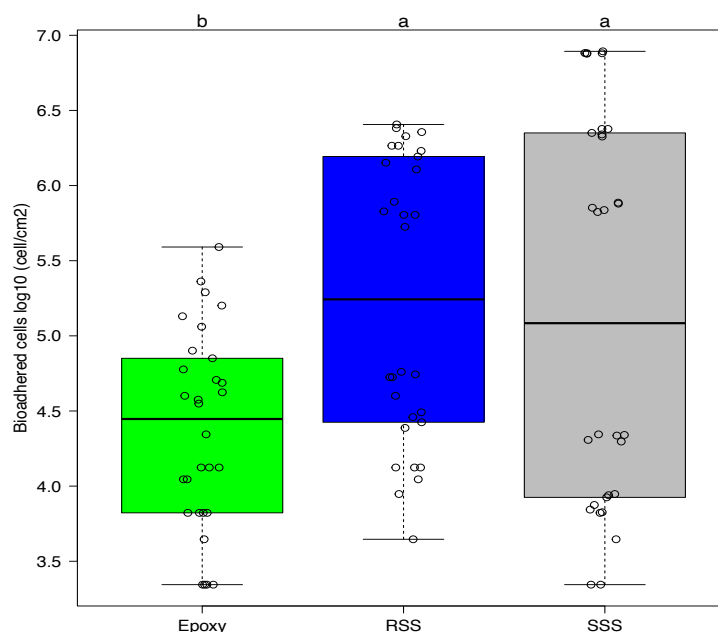


Figure 32 : Capacité de bioadhésion de *B. bruxellensis* sur différents matériaux retrouvés en œnologie. Epoxy : résine époxy ; RSS : acier inoxydable non-poli ; SSS : acier inoxydable poli. Les lettres indiquent des différences significatives (Kruskal Wallis, p-value < 0,05)

Jusqu'à présent dans le cadre de cette thèse, la capacité de bioadhésion par *B. bruxellensis* a été étudiée sur l'acier inoxydable 316L poli (SSS). Dans cette partie, cette capacité est également étudiée sur acier inoxydable 316L non-poli (RSS) et résine époxy GE55. Les résultats obtenus après 3h de bioadhésion et observations par microscopie confocale sont présentés Fig. 32. Selon les matériaux, le nombre de cellules bioadhérées est significativement différent. La bioadhésion sur résine époxy est significativement plus faible avec un nombre moyen de cellules de $6,04 \times 10^4$ cell/cm² contre $7,56 \times 10^5$ cell/cm² et $1,77 \times 10^6$ cell/cm² pour RSS et SSS, respectivement. Aucune différence significative n'est observée entre les aciers inoxydables RSS et SSS, montrant que la finition polie ou non polie n'affecte pas la capacité de bioadhésion de *B. bruxellensis*.

Selon la souche testée, le comportement de bioadhésion est différent en fonction du matériau utilisé (Fig. 33). Les souches AWRI1608 et CBS2499 présentant les propriétés de surfaces les plus hydrophobes montrent la capacité de bioadhésion la plus élevée pour les 3 matériaux testés (respectivement $2,26 \times 10^6$ cell/cm² et $7,63 \times 10^6$ cell/cm² pour SSS, $1,56 \times 10^6$ cell/cm² et $2,24 \times 10^6$ cell/cm² pour RSS et enfin $6,91 \times 10^4$ cell/cm² et $2,22 \times 10^4$ cell/cm² pour l'Epoxy) avec cependant des différences significatives entre les 3 matériaux, la bioadhésion étant la plus

importante sur le support en SSS et la moins importante sur résine époxy présentant la plus forte hydrophilie de surface. Pour les autres souches présentant un caractère plus hydrophile, la capacité de bioadhésion est plus faible sur les 3 matériaux ; la souche YJS8202 présente aucune différence significative de capacité de bioadhésion selon le matériau. Pour la souche YJS8528, la capacité de bioadhésion est significativement plus élevée sur l'acier présentant une finition non-polie.

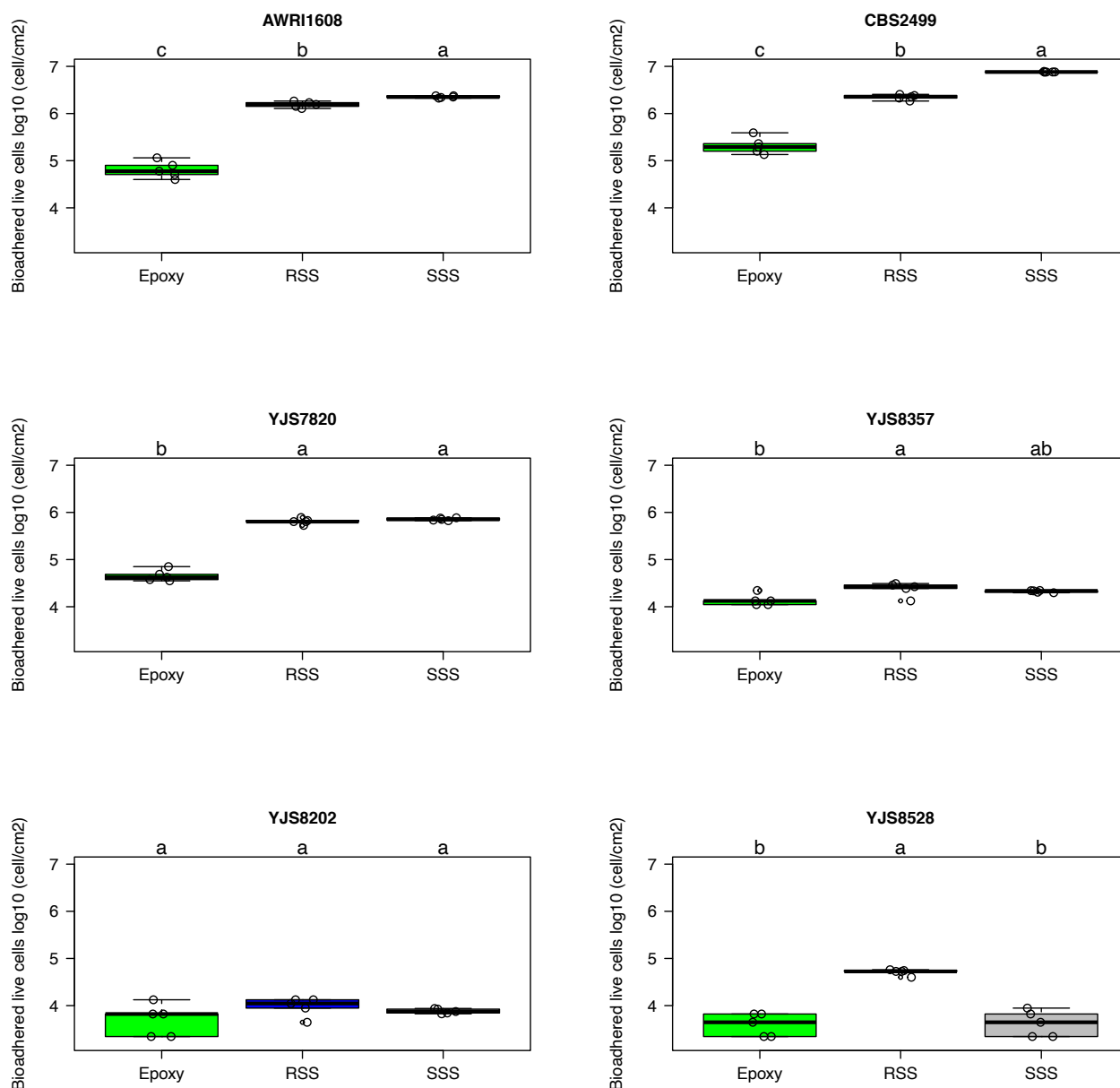


Figure 33 : Capacité de bioadhésion sur différents matériaux selon la souche de *B. bruxellensis*. Les lettres indiquent des différences significatives (Kruskall Wallis, p-value < 0,05)

3.3. Effet d'un traitement antibioadhésion par des biopolymères

L'effet antibioadhésion de 6 polymères biosourcés a été étudié pour la souche AWRI1608 présentant une forte capacité de bioadhésion sur acier inoxydable 316L SSS. Les résultats concernant le nombre de cellules vivantes et mortes bioadhérées sur coupon traités antibioadhésion sont présentés figure 34. La souche AWRI 1608 est capable de bioadhérer sur l'ensemble des 6 polymères utilisés pour l'étude (Fig. 34A). Seul le polymère PDMS/PDMSxPEG permet une diminution du nombre de cellules vivantes bioadhérées de *B. bruxellensis* de 35% par rapport au témoin sur acier inoxydable 316L. Les autres polymères testés ne montrent pas de différences significatives vis-à-vis de la bioadhésion sur acier inoxydable 316L.

Concernant la bioadhésion des cellules mortes, l'impact des polymères antibioadhésion est similaire celui observé sur les cellules vivantes (Fig. 34B). Le polymère PDMS/PDMSxPEG présente ici encore l'action antibioadhésion la plus importante permettant une diminution de la concentration en cellules bioadhérées de 62% par rapport aux cellules mortes bioadhérées sur acier inoxydable 316L. Les autres polymères testés quant à eux ne montrent pas de différences significatives par rapport à une bioadhésion sur acier inoxydable 316L.

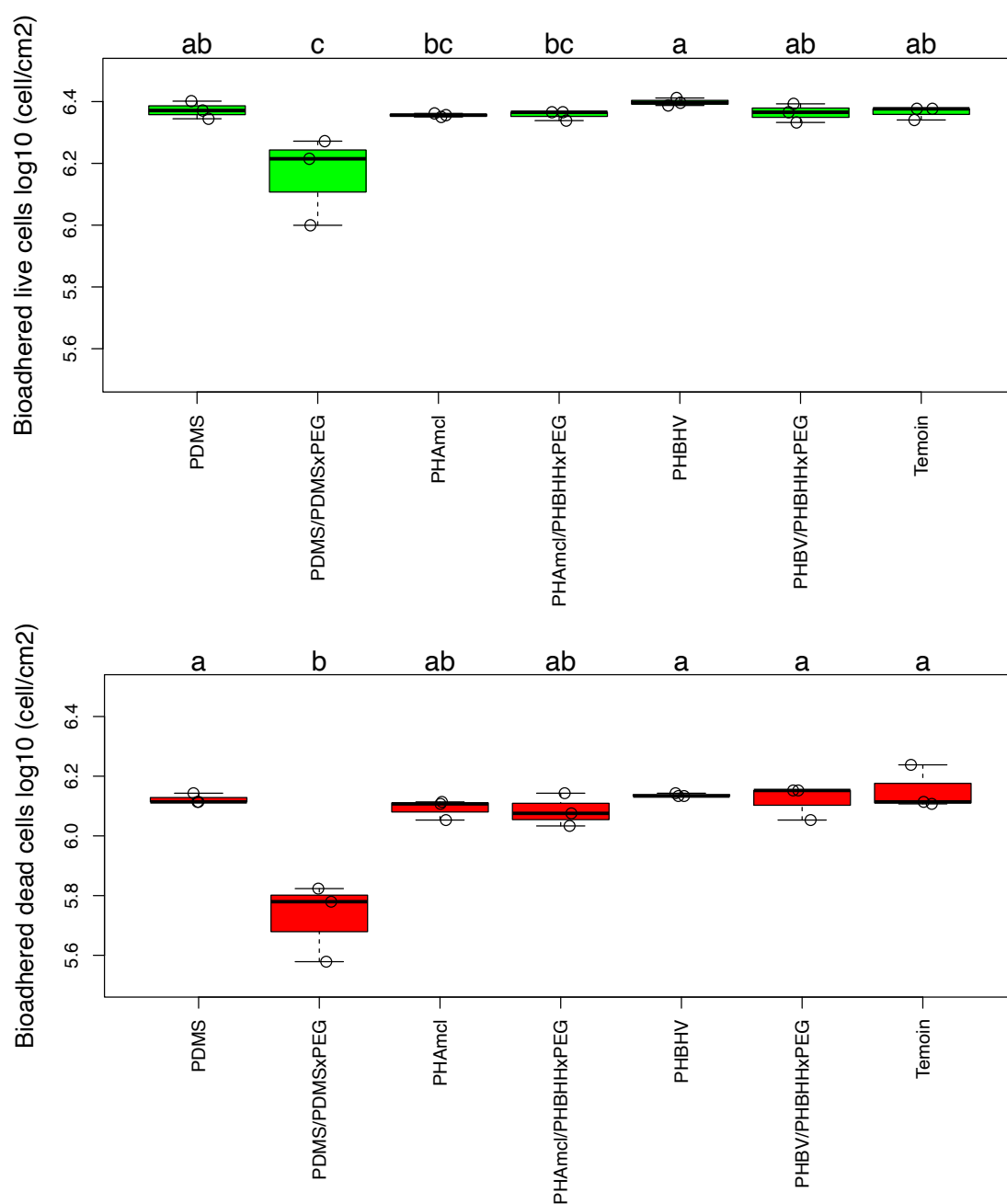


Figure 34 : Capacité de bioadhésion sur différents polymères présentant des activités antibiofilms. Le vert représente les cellules vivantes et le rouge les cellules mortes). Les lettres indiquent des différences significatives (Kruskal Wallis, p-value < 0,05)

4. Discussion

Au cours de cette étude, différents matériaux rencontrés en œnologie ont été utilisés afin d'évaluer l'effet du support sur la capacité de bioadhésion de *B. bruxellensis*. Il a été possible d'obtenir des coupons identiques pour les matériaux sélectionnés permettant de mettre en place des réplicata alors que cela n'aurait pas été possible avec le bois et le béton. Par ailleurs,

différents polymères antifouling ont également été intégrés dans cette étude, afin d'évaluer leur efficacité pour limiter les phénomènes de bioadhésion par *B. bruxellensis*.

4.1. Capacité de bioadhésion de *B. bruxellensis* plus faible sur résine époxy

Les cuves utilisées au cours de la vinification peuvent être façonnées par différents matériaux comme le béton, le bois et l'acier inoxydable. Dans le cas de cuves bétons, un revêtement intérieur de type résine époxy est souvent réalisé car plus facile d'entretien. Notre étude confirme la capacité de bioadhésion de *B. bruxellensis* sur différents types d'acier inoxydable mais aussi, pour la première fois, sur résine époxy. Ainsi cette espèce présente un spectre large d'aptitude à bioadhérer à de nombreux matériaux comme l'attestent des travaux antérieurs qui rapportent que *B. bruxellensis* a pu être identifiée à la surface de verre, d'acier inoxydable, de polystyrène et du bois (Joseph et al., 2007 ; Oelofse et al., 2008 ; Kregiel et al., 2018 ; Lebleux et al., 2020). Par ailleurs, dans nos conditions expérimentales, des différences de bioadhésion ont été observées entre acier inoxydable et résine époxy avec une bioadhésion moins importante sur cette dernière. Nos travaux montrent que, dans nos conditions expérimentales, la résine époxy présente une hydrophobicité de surface plus faible que l'acier inoxydable et est donc plutôt hydrophile en accord la littérature (Ait Iahbib et al., 2023). L'hydrophobicité joue un rôle majeur dans l'établissement de la bioadhésion du fait que les interactions hydrophobes établies entre le support et les cellules sont les plus fortes mises en jeu au cours de la bioadhésion (Urano et al., 2002 ; Verstrepen and Klis., 2006 ; Blanco et al., 2008). Nos résultats (chapitre 2) montrent que la capacité de *B. bruxellensis* à bioadhérer en particulier sur acier inoxydable serait en lien avec l'hydrophobicité de surface des cellules. La diminution de la capacité de bioadhésion sur résine époxy moins hydrophobe que l'acier inoxydable observée dans ce travail renforce cette hypothèse. Cette observation étant d'autant plus importante sur les souches présentant un caractère hydrophobe. La diminution de la capacité de bioadhésion sur résine époxy a également pu être observée chez d'autres microorganismes comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* où la concentration en cellules bioadhérées étaient moins importante sur résine époxy que sur acier inoxydable (Ait Iahbib et al., 2023). Néanmoins, des études réalisées sur d'autres microorganismes comme *Streptococcus mutans* et des diatomées ont montré que la résine époxy permettait au contraire de promouvoir la bioadhésion (Asiry et al., 2018 ; Liang et al., 2019 ; Faria et al., 2021).

L'hypothèse selon laquelle la rugosité du matériau pourrait impacter la bioadhésion est également avancée dans les travaux de Ait Iahbib (2023) qui montre que la rugosité de la résine époxy est moins importante que celle de l'acier inoxydable. La rugosité est connue pour être un

facteur impactant les phénomènes de bioadhésion permettant de piéger les cellules et initier la bioadhésion (Yuan et al., 2017 ; Yang et al., 2022). Dans notre étude, la finition de l'acier inoxydable se traduit par une différence de rugosité entre les 2 références utilisées, le RSS présentant une rugosité de surface importante contrairement au SSS. Les résultats de bioadhésion à l'échelle de l'espèce n'ont pas montré de différences significatives entre les 2 nuances malgré des différences de rugosité ; cette absence de différences pourrait s'expliquer du fait que les 2 aciers ont présenté une hydrophobicité de surface similaire. Cette observation a également été rapportée chez *Listeria monocytogenes*, *P. aeruginosa* et *Candida lipolytica* où la rugosité du support n'a pas d'impact sur la bioadhésion (Hilbert et al., 2003 ; Rodriguez et al., 2008). Cependant des études ont montré, au contraire, que la rugosité joue un rôle majeur dans la bioadhésion (Kukhtyn et al., 2019 ; Tomičić and Raspor., 2017). Par ailleurs, une topographie de surface complexe avec beaucoup de rugosité pourrait inhiber la bioadhésion du fait de zones de contact limitées avec le support (Valle et al., 2015). La rugosité semble donc un facteur dépendant de l'espèce ou de la souche considérée pour expliciter les différences de capacité de bioadhésion.

4.2. Effet de polymères antifouling sur *B. bruxellensis*

L'utilisation de polymères antifouling est une pratique courante dans le domaine maritime afin de réduire la bioadhésion de certains organismes comme les algues et les bernacles, qui, par leur présence sur la coque des bateaux engendrent des pertes de vitesse et des périodes de carénage plus importantes (Piola et al., 2009 ; Farkas et al., 2020). Dans ce cadre, l'effet de différents polymères antifouling d'origines diverses a été testé sur la bioadhésion de *B. bruxellensis*. Les résultats ont ainsi montré que pour 5 des 6 polymères testés aucun effet antifouling n'était observé par rapport à une adhésion sur acier inoxydable comme support témoin. Seule une diminution de la bioadhésion est observable pour les cellules viables et mortes avec le polymère PDMS/PDMSxPEG. Ce polymère constitué de PDMS et de PDMS copolymérisé avec du PEG présente une hydrophobicité réduite du fait de la présence du PEG qui a la particularité d'être un polymère hydrophile. Le PEG présent permet ainsi d'hydrophiliser le polymère lui donnant un caractère amphiphile (Faÿ et al., 2016). Il se crée ainsi une forte couche hydratée à la surface du polymère formant une barrière stérique limitant la bioadhésion (Ngo and Grunlan., 2017) Des travaux réalisés sur des diatomées ont également montré un effet antifouling du PDMS/PDMSxPEG permettant de réduire de la bioadhésion de plus de 80% que lorsque la bioadhésion est réalisée sur PDMS (Guenec et al., 2021). Cependant, l'utilisation de polymères à base de PDMS pose un problème écologique majeur

car le PDMS est un silicone issu de la pétrochimie nécessitant la transformation d'énergies fossiles. Une alternative à l'utilisation de PDMS est la substitution par des biopolymères comme le poly(3-hydroxyalcanoate) (PHA). Ces biopolymères présentent les avantages d'être biodégradables, non toxiques et biocompatibles rendant leur utilisation possible dans l'agroalimentaire et le médical (Zhang et al., 2018 ; Elmowafy et al., 2019). Les résultats de bioadhésion de *B. bruxellensis* sur ces polymères n'ont pas montré d'effets antifouling même avec une copolymérisation au PEG. L'utilisation de ces biopolymères associés ou non à du PEG ont par ailleurs montré chez d'autres microorganismes comme *Bacillus spp* et *Phaeodactylum tricornutum* des effets antifouling importants notamment en présence de PEG (Guenec et al, 2021). L'état de purification du biopolymère a également un impact sur l'efficacité. En effet, il est montré que plus le biopolymère est pur plus son action antifouling est importante chez *Escherichia coli* (Mauclair et al., 2010). Des travaux menés sur l'utilisation de supports antifouling contre *Saccharomyces cerevisiae* n'ont montré aucun effet sur la bioadhésion de la levure (Saulou-Berion., 2009). Des facteurs comme la rugosité du polymère pourraient expliquer le fait que *B. bruxellensis* bioadhère de façon importante sur les biopolymères. Ces biopolymères présentent en effet une rugosité moins importante que les polymères à base de PDMS permettant une zone de contact entre le polymère et la cellule plus importante et ainsi facilitant l'établissement d'interactions.

5. Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence la remarquable capacité de *B. bruxellensis* à bioadhérer à différents matériaux rencontrés en œnologie avec néanmoins des comportements différents selon le matériau utilisé. La nature des matériaux qui composent le cuvier serait un élément impactant les phénomènes de bioadhésion, la contamination des vins et par la même occasion la persistance de l'espèce au chai. Ainsi, quel que soit la souche testée, les phénomènes de bioadhésion sont moins importants sur un revêtement en résine époxy que sur acier inoxydable. Nos résultats obtenus dans le chapitre 4 montrent que *B. bruxellensis* peut être retrouvée à la surface de cristaux de tartre. D'un point de vue pratique, nos travaux conduisent à recommander, pour l'entretien et l'hygiène des cuves bétons, un revêtement à l'aide de résine époxy plutôt que l'affranchissement avec de l'acide tartrique. Par ailleurs, l'utilisation de polymères présentant des propriétés antifouling en dehors du domaine œnologique ne présente aucun effet sur *B. bruxellensis* à l'exception d'un polymère amphiphile issu de la pétrochimie mais ne pouvant pas être compatible avec une utilisation en œnologie étant donné sa toxicité mais également son impact écologique.

Références

- Abebe, G.M., 2020. The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. *International Journal of Microbiology* 2020, e1705814. <https://doi.org/10.1155/2020/1705814>
- Agnolucci, M., Scarano, S., Rea, F., Toffanin, A., Nuti, M., 2007. Detection of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* in pressed Sangiovese grapes by real time PCR. *Italian Journal of Food Science* 19, 153–164.
- Ait lahbib, O., Elgoulli, M., Zanane, C., Lekchiri, S., Zahir, H., El Louali, M., Mabrouki, M., Latrache, H., 2023. Influence of surface properties of resins used as binders for coatings on the theoretical and experimental adhesion of bacteria. *Progress in Organic Coatings* 175, 107374. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2022.107374>
- Asha, A.B., Ounkaew, A., Peng, Y.-Y., Gholipour, M.R., Ishihara, K., Liu, Y., Narain, R., 2022. Bioinspired antifouling and antibacterial polymer coating with intrinsic self-healing property. *Biomaterials Science* 11, 128–139. <https://doi.org/10.1039/d2bm01055k>
- Asiry, M.A., AlShahrani, I., Almoammar, S., Durgesh, B.H., Kheraif, A.A.A., Hashem, M.I., 2018. Influence of epoxy, polytetrafluoroethylene (PTFE) and rhodium surface coatings on surface roughness, nano-mechanical properties and biofilm adhesion of nickel titanium (Ni-Ti) archwires. *Materials Research Express* 5, 026511. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aaabe5>
- Blanco, M.-T., Sacristán, B., Beteta, A., Fernández-Calderón, M.-C., Hurtado, C., Pérez-Giraldo, C., Gómez-García, A.-C., 2008. Cellular surface hydrophobicity as an additional phenotypic criterion applied to differentiate strains of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 60, 129–131. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.013>
- Bokulich, N.A., Ohta, M., Richardson, P.M., Mills, D.A., 2013. Monitoring Seasonal Changes in Winery-Resident Microbiota. *PLoS ONE* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066437>
- Boulangé-Petermann, L., Rault, J., Bellon-Fontaine, M., 2009. Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 11, 201–216. <https://doi.org/10.1080/08927019709378331>
- Branco, P., Candeias, A., Caldeira, A.T., González-Pérez, M., 2020. A simple procedure for detecting *Dekkera bruxellensis* in wine environment by RNA-FISH using a novel probe.

- International Journal of Food Microbiology 314, 108415.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108415>
- Callow, M.E., Fletcher, R.L., 1994. The influence of low surface energy materials on bioadhesion — a review. *International Biodeterioration & Biodegradation, Special Issue Marine Biofouling and Corrosion* 34, 333–348. [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(94\)90092-2](https://doi.org/10.1016/0964-8305(94)90092-2)
- Cepas, V., López, Y., Muñoz, E., Rolo, D., Ardanuy, C., Martí, S., Xercavins, M., Horcajada, J.P., Bosch, J., Soto, S.M., 2019. Relationship Between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microb Drug Resist* 25, 72–79. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0027>
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J. -n., Pons, M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60, 165–178. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740600205>
- Connell, L., Stender, H., Edwards, C.G., 2002. Rapid Detection and Identification of *Brettanomyces* from Winery Air Samples Based on Peptide Nucleic Acid Analysis. *Am J Enol Vitic.* 53, 322–324.
- Desenne, A., Maron, J.M., Jacob, J.M., 2008. Choix des récipients vinaires : incidences oenologiques et environnementales. *Lettre Actualités MATEVI*.
- Dimopoulou, M., Renault, M., Dols-Lafargue, M., Albertin, W., Herry, J.-M., Bellon-Fontaine, M.-N., Masneuf-Pomarede, I., 2019. Microbiological, biochemical, physicochemical surface properties and biofilm forming ability of *Brettanomyces bruxellensis*. *Annals of Microbiology* 69, 1217–1225. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01503-5>
- Elmowafy, E., Abdal-Hay, A., Skouras, A., Tiboni, M., Casettari, L., Guarino, V., 2019. Polyhydroxyalkanoate (PHA): applications in drug delivery and tissue engineering. *Expert Rev Med Devices* 16, 467–482. <https://doi.org/10.1080/17434440.2019.1615439>
- Faria, S.I., Teixeira-Santos, R., Romeu, M.J., Morais, J., Jong, E. de, Sjollema, J., Vasconcelos, V., Mergulhão, F.J., 2021. Unveiling the Antifouling Performance of Different Marine Surfaces and Their Effect on the Development and Structure of Cyanobacterial Biofilms. *Microorganisms* 9, 1102. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051102>
- Farkas, A., Song, S., Degiuli, N., Martić, I., Demirel, Y.K., 2020. Impact of biofilm on the ship propulsion characteristics and the speed reduction. *Ocean Engineering* 199. <https://doi.org/10.1016/j.oceaneng.2020.107033>

- Faÿ, F., Hawkins, M.L., Réhel, K., Grunlan, M.A., Linossier, I., 2016. Non-toxic, anti-fouling silicones with variable PEO–silane amphiphile content. *Green Materials* 4, 53–62. <https://doi.org/10.1680/jgrma.16.00003>
- Finlay, J.A., Callow, M.E., Ista, L.K., Lopez, G.P., Callow, J.A., 2002. The influence of surface wettability on the adhesion strength of settled spores of the green alga *enteromorpha* and the diatom *amphora*. *Integr Comp Biol* 42, 1116–1122. <https://doi.org/10.1093/icb/42.6.1116>
- Flemming, H.-C., Wuertz, S., 2019. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 17, 247–260. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9>
- Fugelsang, K.C., 1997. *Wine Microbiology*. Springer US, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6970-8>
- Genin, S.N., Stewart Aitchison, J., Grant Allen, D., 2014. Design of algal film photobioreactors: material surface energy effects on algal film productivity, colonization and lipid content. *Bioresour Technol* 155, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.060>
- Gillet, G., Azemar, F., Faÿ, F., Réhel, K., Linossier, I., 2018. Non-Leachable Hydrophilic Additives for Amphiphilic Coatings. *Polymers* 10, 445. <https://doi.org/10.3390/polym10040445>
- Gross, M., Zhao, X., Mascarenhas, V., Wen, Z., 2016. Effects of the surface physico-chemical properties and the surface textures on the initial colonization and the attached growth in algal biofilm. *Biotechnol Biofuels* 9, 38. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0451-z>
- Guenneq, A., Brelle, L., Balnois, E., Linossier, I., Renard, E., Langlois, V., Faÿ, F., Chen, G.Q., Simon-Colin, C., Vallée-Réhel, K., 2021. Antifouling properties of amphiphilic poly(3-hydroxyalkanoate): an environmentally-friendly coating. *Biofouling* 37, 894–910. <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1981298>
- Hilbert, L.R., Bagge-Ravn, D., Kold, J., Gram, L., 2003. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52, 175–185. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00104-5](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00104-5)
- 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.
- Kaye, K.S., Petty, L.A., Shorr, A.F., Zilberberg, M.D., 2019. Current Epidemiology, Etiology, and Burden of Acute Skin Infections in the United States. *Clin Infect Dis* 68, S193–S199. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz002>

- Kregiel, D., James, S.A., Rygala, A., Berlowska, 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>
- Krsmanovic, M., Biswas, D., Ali, H., Kumar, A., Ghosh, R., Dickerson, A.K., 2021. Hydrodynamics and surface properties influence biofilm proliferation. *Advances in Colloid and Interface Science* 288. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102336>
- Kukhtyn, M., Kravcheniuk, K., Beyko, L., Horiuk, Y., Skliar, O., Kernychnyi, S., 2019. Modeling the process of microbial biofilm formation on stainless steel with a different surface roughness. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies* 2, 14–21. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2019.160142>
- Lattey, K. a., Bramley, B. r., Francis, I. l., 2010. Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16, 189–202. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00069.x>
- Lebleux, M., Abdo, H., Coelho, C., Basmaciyan, L., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Roullier-Gall, C., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., Weidmann, S., Rousseaux, S., 2020. New advances on the *Brettanomyces bruxellensis* biofilm mode of life. *International Journal of Food Microbiology* 318. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108464>
- Liang, X., Peng, L.-H., Zhang, S., Zhou, S., Yoshida, A., Osatomi, K., Bellou, N., Guo, X.-P., Dobretsov, S., Yang, J.-L., 2019. Polyurethane, epoxy resin and polydimethylsiloxane altered biofilm formation and mussel settlement. *Chemosphere* 218, 599–608. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.120>
- Ma, C., Zhang, W., Zhang, G., Qian, P.-Y., 2017. Environmentally Friendly Antifouling Coatings Based on Biodegradable Polymer and Natural Antifoulant. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 5, 6304–6309. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01385>
- Manecka, G.M., Labrash, J., Rouxel, O., Dubot, P., Lalevée, J., Andaloussi, S.A., Renard, E., Langlois, V., Versace, D.L., 2014. Green Photoinduced Modification of Natural Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Surface for Antibacterial Applications. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2, 996–1006. <https://doi.org/10.1021/sc400564r>
- Mauclaire, L., Brombacher, E., Bünger, J.D., Zinn, M., 2010. Factors controlling bacterial attachment and biofilm formation on medium-chain-length polyhydroxyalkanoates

- (mcl-PHAs). *Colloids Surf B Biointerfaces* 76, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.021>
- Medilanski, E., Kaufmann, K., Wick, L.Y., Wanner, O., Harms, H., 2002. Influence of the surface topography of stainless steel on bacterial adhesion. *Biofouling* 193–203. <https://doi.org/10.1080/08927010290011370>
- Ngo, B.K.D., Grunlan, M.A., 2017. Protein Resistant Polymeric Biomaterials. *ACS Macro Lett.* 6, 992–1000. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.7b00448>
- Oelofse, A., Pretorius, I.S., du Toit, M., 2008. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking: A Synoptic Review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 29, 128–144.
- Perpetuini, G., Rossetti, A.P., Tittarelli, F., Battistelli, N., Arfelli, G., Suzzi, G., Tofalo, R., 2021. Promoting *Candida zemplinina* adhesion on oak chips: A strategy to enhance esters and glycerol content of Montepulciano d’Abruzzo organic wines. *Food Research International* 150, 110772. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110772>
- Piola, R., Dafforn, K., Johnston, E., 2009. The influence of antifouling practices on marine invasions. *Biofouling* 25, 633–644. <https://doi.org/10.1080/08927010903322065>
- Renouf, V., Claisse, O., Miot-Sertier, C., Perello, M.-C., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2006. Study of the microbial ecosystem present on the barrels surface used during the winemaking. *Sciences des Aliments* 26, 427–445. <https://doi.org/10.3166/sda.26.427-445>
- Richards, J.J., Melander, C., 2009. Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem* 10, 2287–2294. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900317>
- Rodriguez, A., Autio, W.R., McLandsborough, L.A., 2008. Effect of surface roughness and stainless steel finish on *Listeria monocytogenes* attachment and biofilm formation. *J Food Prot* 71, 170–175. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.1.170>
- Saulou-Bérion, C., 2009. Evaluation des propriétés anti-adhésives et biocides de films nanocomposites avec inclusions d’argent, déposés sur acier inoxydable par procédé plasma.
- 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>
- Stanford, K., Tran, F., Zhang, P., Yang, X., 2021. Biofilm-Forming Capacity of *Escherichia coli* Isolated from Cattle and Beef Packing Plants: Relation to Virulence Attributes,

- Stage of Processing, Antimicrobial Interventions, and Heat Tolerance. *Appl Environ Microbiol* 87, e0112621. <https://doi.org/10.1128/AEM.01126-21>
- Tamaru, Y., Takani, Y., Yoshida, T., Sakamoto, T., 2005. Crucial Role of Extracellular Polysaccharides in Desiccation and Freezing Tolerance in the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*. *Appl Environ Microbiol* 71, 7327–7333. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7327-7333.2005>
- Tomičić, R., Raspor, P., 2017. Influence of growth conditions on adhesion of yeast *Candida spp.* and *Pichia spp.* to stainless steel surfaces. *Food Microbiol* 65, 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.008>
- Urano, H., Nagata, K., Fukuzaki, S., 2002. Adhesion of *Saccharomyces cerevisiae* to alumina surfaces and its removal by caustic alkali cleaning. *Biocontrol Science* 7, 131–137. <https://doi.org/10.4265/bio.7.131>
- Valdez, B., Schorr, M., Lothan, N., Eliezer, A., 2015. Wineries: Equipment, materials, and corrosion. *Materials Performance* 54, 68–71.
- Valle, J., Burgui, S., Langheinrich, D., Gil, C., Solano, C., Toledo-Arana, A., Helbig, R., Lasagni, A., Lasa, I., 2015. Evaluation of Surface Microtopography Engineered by Direct Laser Interference for Bacterial Anti-Biofouling. *Macromolecular Bioscience* 15, 1060–1069. <https://doi.org/10.1002/mabi.201500107>
- Varela, C., Cuijvers, K., Borneman, A., 2021. Temporal comparison of microbial community structure in an australian winery. *Fermentation* 7. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030134>
- Verstrepen, K.J., Klis, F.M., 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology* 60, 5–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05072.x>
- Yang, K., Shi, J., Wang, L., Chen, Y., Liang, C., Yang, L., Wang, L.-N., 2022. Bacterial anti-adhesion surface design: Surface patterning, roughness and wettability: A review. *Journal of Materials Science & Technology* 99, 82–100. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2021.05.028>
- Yuan, Y., P. Hays, M., R. Hardwidge, P., Kim, J., 2017. Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates. *RSC Advances* 7, 14254–14261. <https://doi.org/10.1039/C7RA01571B>
- Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., Fancello, F., Zara, S., 2020. Yeast biofilm in food realms: occurrence and control. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02911-5>

Zhang, J., Shishatskaya, E.I., Volova, T.G., da Silva, L.F., Chen, G.-Q., 2018. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 86, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.035>

Conclusion et Perspectives

L'objectif premier de ce travail de thèse était la caractérisation des propriétés de bioadhésion et de formation de biofilm de l'espèce *B. bruxellensis* responsable de l'altération organoleptique des vins rouges afin d'expliquer les mécanismes responsables de la persistance de l'espèce au chai. Une approche multidisciplinaire a été mise en place au cours de ce projet faisant appel à des techniques microbiologiques, chimiques, physiques, moléculaires, microscopique et œnologique afin de pouvoir répondre aux questions posées. Par cette conclusion présentée sous formes des 4 grandes questions, nous reviendrons sur les principaux résultats mis en évidence durant ces travaux tout en proposant des perspectives d'études afin d'approfondir le travail réalisé durant cette thèse.

*Des modes de vie en lien avec la diversité génétique chez *Brettanomyces bruxellensis* ?*

B. bruxellensis est une espèce qui se caractérise par une grande diversité génétique en lien avec différents niveaux de ploïdie : individus diploïdes ($2n$) et triploïdes ($3n$) dont des allopoloïdes ($2n+1$) et des autopolloïdes ($3n$) (Gounot et al., 2020). L'étude de la génétique des populations précédemment réalisée au laboratoire sur plus de 1400 souches a permis de montrer que les facteurs niveau de ploïdie, niche écologique et géographie structurent la diversité de cette espèce et a mis en évidence l'existence de 6 groupes génétiques. A cette diversité génétique est associée une grande diversité phénotypique selon la souche et/ou le groupe génétique : capacité de croissance dans le vin (Cibrario et al., 2020), sensibilité au chitosan, aux radiations ultraviolets, à la lumière pulsée (Paulin et al. 2020 ; Pilard et al., 2021 ; Harrouard et al., 2023). Par ailleurs, Avramova (2018) a pu confirmer et valider la relation entre tolérance aux sulfites et groupe génétique. Nos travaux montrent également que la totalité des souches testées (170 individus) présentent une capacité de bioadhésion sur acier inoxydable mais avec des différences significatives selon le groupe génétique ; le groupe Beer est celui présentant la capacité de bioadhésion la plus importante. C'est le cas également pour la croissance pseudohyphale, où le groupe Teq/EtOH est celui produisant un nombre significativement plus élevé de ces cellules spécifiques.

Ce lien entre phénotype et groupe génétique suggère l'implication de déterminants génétiques sous-jacent à l'expression des phénotypes bioadhésion et croissance pseudohyphale. Le séquençage récent de génomes de *B. bruxellensis* ouvre la voie vers l'identification de ces déterminants génétiques. Dans un premier temps, une analyse GWAS (Genome Wide Association Study) sur les souches phénotypées permettrait l'identification des régions du génome responsables des phénotypes observés et permettre de formuler des hypothèses sur

l'identification des gènes impliqués. Cependant, des approches de transformation génétique seront nécessaires dans la validation des hypothèses. Chez *B. bruxellensis*, la transformation génétique reste pour l'heure peu développée (Varela et al. 2018 ; 2020 et 2022).

Enfin, d'un point de vue appliqué à l'œnologie, la conception et la mise en place d'outils moléculaires simples basés sur l'identification de ces déterminants génétiques permettrait pour les praticiens d'évaluer le risque de bioadhésion des souches présentes au chai et ainsi adapter en conséquence les procédures de nettoyage.

Quels impacts des propriétés physico-chimiques de surface sur la bioadhésion et la formation de biofilm chez B. bruxellensis ?

La formation d'un biofilm est conditionnée par la bioadhésion des microorganismes à la surfaces d'un support qui s'établissent à la suite de l'interactions physico-chimiques entre les cellules et le matériau. Ces interactions sont définies par les propriétés physico-chimiques de surface des cellules et du support comme la charge de surface et l'hydrophobicité.

Concernant les propriétés de surface de *B. bruxellensis*, nos travaux ont montré une charge de surface négative dont l'impact est limité sur la bioadhésion de *B. bruxellensis*. Dans un second temps, nous avons pu montrer que *B. bruxellensis* possédait un caractère de surface hydrophile à l'exception de certaines souches notamment du groupe Beer présentant une forte hydrophobicité. Cette forte hydrophobicité est corrélée à une importante capacité de bioadhésion sur acier inoxydable.

Concernant les propriétés de surface des matériaux, nous avons pu montrer que l'acier inoxydable après lavage présentait une surface hydrophobe favorisant ainsi l'adhésion des souches de *B. bruxellensis* hydrophobes. Par ailleurs, un contact prolongé dans le vin entraîne une hydrophilisation de l'inox. Une diminution de la bioadhésion à la surface de matériau plus hydrophiles comme la résine époxy est montré. Ainsi, dans le cas de *B. bruxellensis*, l'hydrophobicité de surface semble jouer un rôle majeur lors de la bioadhésion. Au niveau cellulaire, cette hydrophobicité est directement liée à la composition membranaire. Une étude de protéomique de surface des cellules nous permettrait d'identifier des protéines de surface potentiellement responsables de cette hydrophobicité. L'utilisation d'un marquage par immunofluorescence est également envisageable pour identifier la présence d'une protéine mais également sa localisation à la surface de la cellule.

À la suite de la bioadhésion, nous avons montré par microscopie la capacité de formation de biofilm mature chez *B. bruxellensis* avec la formation d'une matrice extracellulaire à la surface

et entre les cellules. La composition de cette matrice reste pour l'heure inconnue, l'identification des composants la constituant permettrait une meilleure compréhension des mécanismes de formation des biofilms de l'espèce.

*Les facteurs environnementaux ont-ils une influence sur la bioadhésion et la formation de biofilm chez *B. bruxellensis* ?*

Le vin est un environnement stressant pour les microorganismes du fait d'une concentration en éthanol importante, un pH bas, la présence de sulfites et une faible concentration en nutriments. Cependant, *B. bruxellensis* en lien avec des capacités d'adaptation remarquables est capable de croître dans cet environnement en métabolisant des nutriments non assimilables par d'autres microorganismes et du fait de mécanismes de tolérance/résistance.

Dans cet environnement vinaire, nous avons montré que *B. bruxellensis* était capable de bioadhérer à l'acier inoxydable, quel que soit la valeur du pH et la concentration en éthanol. Les propriétés de surfaces et la croissance pseudohyphale ne sont pas également impactées. Seul un faible effet a été observé sur la mortalité des cellules bioadhérées en présence d'une forte concentration en éthanol et cela en lien avec le groupe génétique. Les effets souches et groupes génétiques expliquent la plus grande partie de la variance des phénotypes étudiés renforçant ici encore l'hypothèse d'un rôle majeur joué par les déterminants génétiques dans l'expression des phénotypes. D'autres facteurs environnementaux abiotiques peuvent impacter la formation de biofilm et la croissance pseudohyphale. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer l'impact de la concentration en sucre ou de la température sur ces 2 phénotypes. Enfin, un autre point intéressant serait d'étudier l'effet du SO₂ (principal antimicrobien utilisé en œnologie) sur la capacité de bioadhésion comme moyen de prévention mais également sur des biofilms déjà formés. Plus généralement, l'impact du mode de vie (biofilm, croissance pseudohyphale) de *B. bruxellensis* sur la tolérance vis-à-vis de cet antiseptique serait également à étudier.

La présence de plusieurs souches de *B. bruxellensis* ne semble pas augmenter la capacité à former du biofilm ; une diminution de l'épaisseur du biofilm est même observée. Cependant, il est possible de voir que la souche la plus bioadhésive est majoritaire dans le biofilm avec tout de même des variations au cours du temps dans la proportion de chaque souche. Il serait intéressant de refaire cette expérience mais sur un temps plus long afin d'observer la dynamique des 2 souches au sein d'un biofilm plus complexe et de comparer cette dynamique à une modalité liquide où les 2 souches seraient en compétition sous forme planctonique.

Concernant les facteurs biotiques, la présence de bactéries bioadhérées sur acier inoxydable et principalement *O. oeni* entraîne une diminution de la bioadhésion de *B. bruxellensis*. La mise en place d'un biofilm d'*O. oeni* agirait donc comme un biofilm positif vis-à-vis de la bioadhésion de *B. bruxellensis*. Lors du processus d'élaboration des vins, ce biofilm bactérien positif pourrait intervenir en fin de fermentation malolactique ou en début d'élevage lorsque les niveaux de populations de bactéries lactiques sont très élevés. Cependant, nos travaux ont montré que la formation d'un biofilm plurispèces sous forme de microcolonies sécrétant de la matrice extracellulaire favorise ainsi la persistance de *B. bruxellensis*. Enfin, la présence d'*A. pasteurianus* au sein d'un biofilm mature engendre une augmentation de la population de *B. bruxellensis* sans doute liée à la perte de viabilité puis l'autolyse des cellules permettant de libérer des nutriments disponibles pour *B. bruxellensis*. Il serait ainsi intéressant de réitérer l'expérience et effectuer un suivi physico-chimique du vin afin corréliser la disponibilité de nutriments à la mortalité. L'étude des biofilms plurispèces doit également être poursuivie en testant i) différentes souches de microorganismes d'*O. oeni*, d'*A. pasteurianus* et *B. bruxellensis* dans différents vins mais également différentes espèces de microorganismes comme *S. cerevisiae* et *Lactiplantibacillus plantarum* et ii) une coinoculation directe entre *O. oeni* et *B. bruxellensis* afin d'évaluer quel microorganisme est susceptible de bioadhérer en premier et si la cinétique de croissance du biofilm est similaire à celle lors d'une inoculation séquentielle comme réalisé dans ce travail de thèse.

La gestion de l'hygiène, un point central dans la persistance de B. bruxellensis au chai ?

Au cours de l'année, les niveaux de population en microorganismes évoluent pour être à leurs maximums au cours de la campagne de vinification. Ces populations qu'elles soient indigènes issues du chai ou du raisin sont capables de coloniser de très nombreuses surfaces et persister au cours du temps. Nos travaux ont montré qu'en fin de campagne vinicole, les niveaux de population fongique étaient importants avec cependant des variations d'une propriété à une autre. Les moisissures sont majoritairement retrouvées dans l'air. La détection de *B. bruxellensis* dans l'air indique une pression importante de l'espèce au chai et qu'il s'agit d'un vecteur potentiel de dissémination de l'espèce. Des prélèvements de surface sur différents matériaux ont également révélés la présence de *B. bruxellensis*. Enfin, nos observations ont montré que *B. bruxellensis* pouvaient être identifiée à des niveaux de population élevés dans le tartre des cuves à la suite des vinifications ainsi que dans les zones où le nettoyage est difficile à mettre en place. Il serait intéressant d'étendre cette étude à de nouvelles propriétés afin de

conforter les données obtenues en intégrant également l'analyse de la composante bactérienne dans les prélèvements. De plus, le suivi sur une année complète et d'une campagne à l'autre des dynamiques de populations au chai pourrait permettre d'identifier si les périodes de contamination des vins sont corrélées aux moments où les niveaux de population dans l'environnement du chai sont les plus importants. D'un point de vue plus globale, les approches de type séquençage monogénique des ARNs 16S et 18S pour l'analyse *in situ* des biofilms présents à la cave constitue des méthodes de choix pour une approche plus fine et complète de la diversité des communautés microbiennes présentes à la surface des matériaux.

La présence de *B. bruxellensis* à la surface des cuves et sur le matériel vinaire mal nettoyées induit un risque de contamination des vins mis à leur contact. En effet, nous avons pu reproduire ce phénomène au laboratoire ; ainsi une surface recouverte d'un biofilm de *B. bruxellensis* immergée dans du vin engendre une contamination de celui-ci par un décrochage de cellules suivi d'une croissance dans le vin avec production des phénols volatils. Cette observation confirme le fait qu'une bonne hygiène est nécessaire afin de limiter la contamination. Pour ce faire, il est primordial de nettoyer correctement les cuves et le matériel après utilisation en utilisant des produits adaptés. A la suite de ce travail, il serait judicieux d'étudier l'impact des produits de nettoyage et de désinfection commerciaux sur les cellules bioadhérées ainsi que sur les biofilms afin de déterminer leur efficacité. Un protocole de nettoyage ciblé sur la modification des propriétés de surface des matériaux en particulier l'acier inoxydable dans le but de les rendre moins hydrophobe pourrait être testé pour limiter l'adhésion de *B. bruxellensis*. Enfin, de nouveaux procédés comme la lumière pulsée et le traitement aux UV sont utilisés pour la désinfection des cuves. Les travaux menés dans le laboratoire ont mis en évidence un effet négatif avéré sur *B. bruxellensis* ; il pourrait être intéressant de tester leur impact sur les biofilms de *B. bruxellensis*.

Références Bibliographiques

- Abad, L., Josse, J., Tasse, J., Lustig, S., Ferry, T., Diot, A., Laurent, F., Valour, F., 2020. Antibiofilm and intraosteoblastic activities of rifamycins against *Staphylococcus aureus*: promising in vitro profile of rifabutin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 75, 1466–1473. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa061>
- Abdo, H., 2020. Biodiversité fongique dans une nouvelle cuverie et dynamique des populations en cuverie (*Saccharomyces cerevisiae*) et en cave d'élevage (*Brettanomyces bruxellensis*). Université de Bourgogne Franche-Comté.
- Abdo, Hany, Catacchio, C.R., Ventura, M., D'Addabbo, P., Alexandre, H., Guilloux-Bénatier, M., Rousseaux, S., 2020. The establishment of a fungal consortium in a new winery. *Sci Rep* 10, 7962. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64819-2>
- Abdo, H., Catacchio, C.R., Ventura, M., D'addabbo, P., Calabrese, F.M., Laurent, J., David-Vaizant, V., Alexandre, H., Guilloux-Bénatier, M., Rousseaux, S., 2020. Colonization of wild *saccharomyces cerevisiae* strains in a new winery. *Beverages* 6, 1–15. <https://doi.org/10.3390/beverages6010009>
- Abebe, G.M., 2020. The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. *International Journal of Microbiology* 2020, e1705814. <https://doi.org/10.1155/2020/1705814>
- ADAM, B., BAILLIE, G.S., DOUGLAS, L.J., 2002. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology* 51, 344–349. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-4-344>
- Agarbati, A., Ciani, M., Esin, S., Agnolucci, M., Marcheggiani, F., Tiano, L., Comitini, F., 2023. Comparative Zymocidial Effect of Three Different Killer Toxins against *Brettanomyces bruxellensis* Spoilage Yeasts. *International Journal of Molecular Sciences* 24, 1309. <https://doi.org/10.3390/ijms24021309>
- Agnolucci, M., Scarano, S., Rea, F., Toffanin, A., Nuti, M., 2007. Detection of *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* in pressed Sangiovese grapes by real time PCR. *Italian Journal of Food Science* 19, 153–164.
- Agnolucci, M., Tirelli, A., Cocolin, L., Toffanin, A., 2017. *Brettanomyces bruxellensis* yeasts: impact on wine and winemaking. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2345-z>
- 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. *Int J Food Microbiol* 130, 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.025>
- Aguilar Uscanga, M.G., Délia, M.-L., Strehaiano, P., 2003. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol* 61, 157–162. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1197-z>
- Aguilar Uscanga, M.G., Delia, M.L., Strehaiano, P., 2000. Nutritional requirements of *Brettanomyces bruxellensis*: growth and physiology in batch and chemostat cultures. *Can J Microbiol* 46, 1046–1050. <https://doi.org/10.1139/w00-089>
- Ait lahbib, O., Elgoulli, M., Zanane, C., Lekchiri, S., Zahir, H., El Louali, M., Mabrouki, M., Latrache, H., 2023. Influence of surface properties of resins used as binders for coatings on the theoretical and experimental adhesion of bacteria. *Progress in Organic Coatings* 175, 107374. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2022.107374>
- Albertin, W., Marullo, P., 2012. Polyploidy in fungi: evolution after whole-genome duplication. *Proc Biol Sci* 279, 2497–2509. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0434>
- 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>
- Alexandre, H., Bertrand, F., Charpentier, C., 1998. Ethanol induced yeast film formation with cell surface hydrophobicity as a major determinant. *Food Technology and Biotechnology* 36, 27–30.
- Alexandre, H., Rousseaux, I., Charpentier, C., 1994. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol Lett* 124, 17–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07255.x>
- Alston, J.M., Arvik, T., Hart, J., Lapsley, J.T., 2021. Brettanomics I: The Cost of *Brettanomyces* in California Wine Production. *Journal of Wine Economics* 16, 4–31. <https://doi.org/10.1017/jwe.2020.20>
- 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, 173–195. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121805>
- Amaral, P.F.F., da Silva, J.M., Lehocky, M., Barros-Timmons, A.M.V., Coelho, M.A.Z., Marrucho, I.M., Coutinho, J.A.P., 2006. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry* 41, 1894–1898. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.029>
- Andorrà, I., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J.M., Mas, A., 2010. Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. *Int J Food Microbiol* 144, 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.003>
- Antolak, H., Piechota, D., Kucharska, A., 2021. Kombucha Tea—A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). *Antioxidants* 10, 1541. <https://doi.org/10.3390/antiox10101541>
- Asha, A.B., Ounkaew, A., Peng, Y.-Y., Gholipour, M.R., Ishihara, K., Liu, Y., Narain, R., 2022. Bioinspired antifouling and antibacterial polymer coating with intrinsic self-healing property. *Biomaterials Science* 11, 128–139. <https://doi.org/10.1039/d2bm01055k>
- Asiry, M.A., AlShahrani, I., Almoammar, S., Durgesh, B.H., Kheraif, A.A.A., Hashem, M.I., 2018. Influence of epoxy, polytetrafluoroethylene (PTFE) and rhodium surface coatings on surface roughness, nano-mechanical properties and biofilm adhesion of nickel titanium (Ni-Ti) archwires. *Materials Research Express* 5, 026511. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aaabe5>
- Aumeran, Balestrino, Forestier, 2020. Biofilms bactériens et santé. *Encyclopédie de l'environnement*. URL <https://www.encyclopedie-environnement.org/sante/biofilms-bacteriens/> (accessed 1.17.23).
- 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>

- Baiano, A., 2021. Craft beer: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20, 1829–1856. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12693>
- Balentine, D.A., Wiseman, S.A., Bouwens, L.C.M., 1997. The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37, 693–704. <https://doi.org/10.1080/10408399709527797>
- 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. *Int J Food Microbiol* 121, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.020>
- Barbin, P., Cheval, J.-L., Gilis, J.-F., Strehaiano, P., Taillandier, P., 2008. Diversity in Spoilage Yeast *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* Isolated from French Red Wine. Assessment During Fermentation of Synthetic Wine Medium. *Journal of the Institute of Brewing* 114, 69–75. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00307.x>
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D., 1990. *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge University Press (CUP) Cambridge.
- Barret, Bidan, P., André, P., 1995. Sur quelques accidents de vinification dus à des levures à voile. *CR Acad. Agric.* 426–431.
- 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. *Frontiers in Microbiology* 7.
- Beckner, M., Ivey, M. l., Phister, T. g., 2011. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letters in Applied Microbiology* 53, 387–394. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03124.x>
- Beckwith, J.K., Ganesan, M., VanEpps, J.S., Kumar, A., Solomon, M.J., 2022. Rheology of *Candida albicans* fungal biofilms. *Journal of Rheology* 66, 683–697. <https://doi.org/10.1122/8.0000427>
- Beech, F.W., 1993. *Yeasts in cider-making*. The yeasts, Academic Press 169–213.
- Belini, V.L., Junior, O.M., Ceccato-Antonini, S.R., Suhr, H., Wiedemann, P., 2021. Morphometric quantification of a pseudohyphae forming *Saccharomyces cerevisiae* strain using in situ microscopy and image analysis. *Journal of Microbiological Methods* 190, 106338. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106338>

- Belini, V.L., Suhr, H., Wiedemann, P., 2020. Online monitoring of the morphology of an industrial sugarcane biofuel yeast strain via in situ microscopy. *Journal of Microbiological Methods* 175, 105973. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105973>
- Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J., Van Oss, C.J., 1996. Microbial adhesion to solvents: A novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7, 47–53. [https://doi.org/10.1016/0927-7765\(96\)01272-6](https://doi.org/10.1016/0927-7765(96)01272-6)
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagensen, J.A.J., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B., Ghigo, J.-M., 2004. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol* 51, 659–674. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03865.x>
- Benítez-Cabello, A., Romero-Gil, V., Rodríguez-Gómez, F., Garrido-Fernández, A., Jiménez-Díaz, R., Arroyo-López, F.N., 2015. Evaluation and identification of poly-microbial biofilms on natural green Gordal table olives. *Antonie van Leeuwenhoek* 108, 597–610. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0515-2>
- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., Suárez-Lepe, J. a., 2009. Factors Affecting the Hydroxycinnamate Decarboxylase/Vinylphenol Reductase Activity of *Dekkera/Brettanomyces*: Application for *Dekkera/Brettanomyces* Control in Red Wine Making. *Journal of Food Science* 74, M15–M22. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00977.x>
- Berne, C., Ellison, C.K., Ducret, A., Brun, Y.V., 2018. Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nat Rev Microbiol* 16, 616–627. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0057-5>
- Bhat, G., Kotigadde, S., Kotian, S., 2012. Effect of pH on the adherence, surface hydrophobicity and the biofilm formation of *Gardnerella vaginalis*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 6, 967–969.
- BIVB, 2017. Bonnes Pratiques : les phénols volatils dans les vins rouges [WWW Document]. URL <https://extranet.bivb.com/technique-et-qualite/publications-techniques/plaquettes-techniques/bonnes-pratiques-les-phenols-volatils-dans-les-vins-rouges,1976,11690.html?> (accessed 3.18.23).
- Blanco, M.-T., Sacristán, B., Beteta, A., Fernández-Calderón, M.-C., Hurtado, C., Pérez-Giraldo, C., Gómez-García, A.-C., 2008. Cellular surface hydrophobicity as an additional phenotypic criterion applied to differentiate strains of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 60, 129–131. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.013>

- Blankenship, J.R., Mitchell, A.P., 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol* 9, 588–594. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.10.003>
- Blomqvist, J., South, E., Tiukova, I., Momeni, M.H., Hansson, H., Ståhlberg, J., Horn, S.J., Schnürer, J., Passoth, V., 2011. Fermentation of lignocellulosic hydrolysate by the alternative industrial ethanol yeast *Dekkera bruxellensis*. *Lett Appl Microbiol* 53, 73–78. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03067.x>
- 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>
- Bokulich, N.A., Bamforth, C.W., Mills, D.A., 2012. Brewhouse-Resident Microbiota Are Responsible for Multi-Stage Fermentation of American Coolship Ale. *PLOS ONE* 7, e35507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035507>
- Bokulich, N.A., Ohta, M., Richardson, P.M., Mills, D.A., 2013. Monitoring Seasonal Changes in Winery-Resident Microbiota. *PLOS ONE* 8, e66437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066437>
- Borlee, B.R., Goldman, A.D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2010. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol Microbiol* 75, 827–842. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06991.x>
- Börlin, M., Venet, P., Claisse, O., Salin, F., Legras, J.-L., Masneuf-Pomarede, I., 2016. Cellar-Associated *Saccharomyces cerevisiae* Population Structure Revealed High-Level Diversity and Perennial Persistence at Sauternes Wine Estates. *Applied and Environmental Microbiology* 82, 2909–2918. <https://doi.org/10.1128/AEM.03627-15>
- Borneman, A.R., Zeppel, R., Chambers, P.J., Curtin, C.D., 2014. Insights into the *Dekkera bruxellensis* Genomic Landscape: Comparative Genomics Reveals Variations in Ploidy and Nutrient Utilisation Potential amongst Wine Isolates. *PLoS Genetics* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004161>
- Boulangé-Petermann, L., Rault, J., Bellon-Fontaine, M., 2009. Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 11, 201–216. <https://doi.org/10.1080/08927019709378331>
- Boutaleb, N., Latrache, H., Sire, O., 2008. Interactions bactéries-matériaux dans les canalisations d'eau potable. Rôle des propriétés physico-chimique de surface sur le pouvoir d'adhésion. *Tech. Sci. Meth.* 11, 73–80.

- Branco, P., Candeias, A., Caldeira, A.T., González-Pérez, M., 2020. A simple procedure for detecting *Dekkera bruxellensis* in wine environment by RNA-FISH using a novel probe. *International Journal of Food Microbiology* 314, 108415. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108415>
- Brandwein, M., Steinberg, D., Meshner, S., 2016. Microbial biofilms and the human skin microbiome. *npj Biofilms Microbiomes* 2, 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41522-016-0004-z>
- Bridier, A., Briandet, R., 2022. Microbial Biofilms: Structural Plasticity and Emerging Properties. *Microorganisms* 10. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010138>
- Bridier, A., Sanchez-Vizueté, 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>
- Brilhante, R.S.N., de Lima, R.A.C., Marques, F.J. de F., Silva, N.F., Caetano, É.P., Castelo-Branco, D. de S.C.M., Bandeira, T. de J.P.G., Moreira, J.L.B., Cordeiro, R. de A., Monteiro, A.J., Camargo, Z.P. de, Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G., 2015. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: in vitro susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. *Journal of Medical Microbiology* 64, 394–399. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000030>
- Brown, G.D., Denning, D.W., Levitz, S.M., 2012. Tackling human fungal infections. *Science* 336, 647. <https://doi.org/10.1126/science.1222236>
- Brückner, S., Mösch, H.-U., 2012. Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 36, 25–58. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00275.x>
- Brugnoni, L.I., Lozano, J.E., Cubitto, M.A., 2007. Potential of yeast isolated from apple juice to adhere to stainless steel surfaces in the apple juice processing industry. *Food Research International* 40, 332–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.10.003>
- Bryan, N.C., Christner, B.C., Guzik, T.G., Granger, D.J., Stewart, M.F., 2019. Abundance and survival of microbial aerosols in the troposphere and stratosphere. *ISME J* 13, 2789–2799. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0474-0>
- Bušić, A., Marđetko, N., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Ivančić Šantek, M., Komes, D., Novak, S., Šantek, B., 2018. Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. *Food Technol Biotechnol* 56, 289–311. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5546>

- Cai, J., Zhu, B.-Q., Wang, Y.-H., Lu, L., Lan, Y.-B., Reeves, M.J., Duan, C.-Q., 2014. Influence of pre-fermentation cold maceration treatment on aroma compounds of Cabernet Sauvignon wines fermented in different industrial scale fermenters. *Food Chem* 154, 217–229. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.003>
- Callow, M.E., Fletcher, R.L., 1994. The influence of low surface energy materials on bioadhesion — a review. *International Biodeterioration & Biodegradation, Special Issue Marine Biofouling and Corrosion* 34, 333–348. [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(94\)90092-2](https://doi.org/10.1016/0964-8305(94)90092-2)
- Camilo, S., Chandra, M., Branco, P., Malfeito-Ferreira, M., 2022. Wine Microbial Consortium: Seasonal Sources and Vectors Linking Vineyard and Winery Environments. *Fermentation* 8. <https://doi.org/10.3390/fermentation8070324>
- Camiolo, S., Porru, C., Benítez-Cabello, A., Rodríguez-Gómez, F., Calero-Delgado, B., Porceddu, A., Budroni, M., Mannazzu, I., Jiménez-Díaz, R., Arroyo-López, F.N., 2017. Genome overview of eight *Candida boidinii* strains isolated from human activities and wild environments. *Stand Genomic Sci* 12, 70. <https://doi.org/10.1186/s40793-017-0281-z>
- 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 Microbiol* 59, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.007>
- Carbonero-Pacheco, J., Moreno-García, J., Moreno, J., García-Martínez, T., Mauricio, J.C., 2022. Revealing the Yeast Diversity of the Flor Biofilm Microbiota in Sherry Wines Through Internal Transcribed Spacer-Metabarcoding and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. *Frontiers in Microbiology* 12.
- Carpena, M., Fraga-Corral, M., Otero, P., Nogueira, R.A., Garcia-Oliveira, P., Prieto, M.A., Simal-Gandara, J., 2021. Secondary aroma: Influence of wine microorganisms in their aroma profile. *Foods* 10. <https://doi.org/10.3390/foods10010051>
- Cartwright, Z.M., Glawe, D.A., Edwards, C.G., 2018. Reduction of *Brettanomyces bruxellensis* Populations from Oak Barrel Staves Using Steam. *Am J Enol Vitic.* 69, 400–409. <https://doi.org/10.5344/ajev.2018.18024>
- Cepas, V., López, Y., Muñoz, E., Rolo, D., Ardanuy, C., Martí, S., Xercavins, M., Horcajada, J.P., Bosch, J., Soto, S.M., 2019. Relationship Between Biofilm Formation and

- Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microb Drug Resist* 25, 72–79. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0027>
- Chaieb, K., Chehab, O., Zmantar, T., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., 2007. In vitro effect of pH and ethanol on biofilm formation by clinical *ica*-positive *Staphylococcus epidermidis* strains. *Annals of Microbiology* 57, 431–437. <https://doi.org/10.1007/BF03175085>
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., Gachhui, R., 2016. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *Int J Food Microbiol* 220, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>
- Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, M.A., 2001. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *Journal of Bacteriology* 183, 5385–5394. <https://doi.org/10.1128/JB.183.18.5385-5394.2001>
- Chatonnet, P., Boidron, J.-N., Dubourdieu, D., 1993. Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur leur teneur en acide acétique et en éthylphenols. *OENO One* 27, 277–298. <https://doi.org/10.20870/oenone.1993.27.4.1160>
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J. -n., Pons, M., 1992. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60, 165–178. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740600205>
- Chrzanowski, Ł., Bielicka-Daszkiwicz, K., Owsianiak, M., Aurich, A., Kaczorek, E., Olszanowski, A., 2008. Phenol and n-alkanes (C12 and C16) utilization: influence on yeast cell surface hydrophobicity. *World J Microbiol Biotechnol* 24, 1943–1949. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9704-8>
- Cibrario, A., 2017. Diversité génétique et phénotypique de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis*: influence sur son potentiel d'altération des vins rouges (These de doctorat). Bordeaux.
- Cibrario, A., Avramova, M., Dimopoulou, M., Magani, M., Miot-Sertier, C., Mas, A., Portillo, M.C., Ballestra, P., Albertin, W., Masneuf-Pomarede, I., Dols-Lafargue, M., 2019. *Brettanomyces bruxellensis* wine isolates show high geographical dispersal and long persistence in cellars. *PLoS ONE* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222749>
- 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., 2020. *Brettanomyces bruxellensis* phenotypic diversity, tolerance to wine stress and wine spoilage ability. *Food Microbiology* 87. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103379>

- Cibrario, Alice, Perello, M.C., Miot-Sertier, C., Riquier, L., de Revel, G., Ballestra, P., Dols-Lafargue, M., 2020a. Carbohydrate composition of red wines during early aging and incidence on spoilage by *Brettanomyces bruxellensis*. *Food Microbiology* 92, 103577. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103577>
- Cibrario, Alice, Sertier, C.M., Riquier, L., Revel, G. de, Masneuf-Pomarède, I., Ballestra, P., Dols-Lafargue, M., 2020b. Cellar Temperature Affects *Brettanomyces bruxellensis* Population and Volatile Phenols Production in Aging Bordeaux Wines. *Am J Enol Vitic.* 71, 1–9. <https://doi.org/10.5344/ajev.2019.19029>
- Ciccarone, C., Petrucci, L., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., 2012. Qualitative survey of fungi isolated from wine-aging environment: Fungi from wine-aging. *International Journal of Food Science & Technology* 47, 1138–1143. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.02952.x>
- Claussen, N.H., 1904. On a Method for the Application of Hansen's Pure Yeast System in the Manufacturing of Well-Conditioned English Stock Beers. *Journal of the Institute of Brewing* 10, 308–331. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1904.tb04656.x>
- Coelho, C., Gougeon, R.D., Perepelkine, L., Alexandre, H., Guzzo, J., Weidmann, S., 2019. Chemical Transfers Occurring Through *Oenococcus oeni* Biofilm in Different Enological Conditions. *Frontiers in Nutrition* 6.
- Colla, G., Kim, H.-J., Kyriacou, M.C., Roupheal, Y., 2018. Nitrate in fruits and vegetables. *Scientia Horticulturae* 237, 221–238. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.016>
- Comitini, F., 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, 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. *Am J Enol Vitic.* 53, 322–324.
- 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*.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.J., 1978. How bacteria stick. *Sci Am* 238, 86–95. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0178-86>

- 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>
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., Fall, A., Daube, G., Coton, E., 2017. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology* 93, fix048. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>
- Crauwels, Sam, Steensels, J., Aerts, G., Willems, K., Verstrepen, K., Lievens, B., 2015. *Brettanomyces Bruxellensis*, Essential Contributor in Spontaneous Beer Fermentations Providing Novel Opportunities for the Brewing Industry. *Brewing Science* 68, 110–121.
- Crauwels, S., Van Assche, A., de Jonge, R., Borneman, A.R., Verreth, C., Troels, P., De Samblanx, G., Marchal, K., Van de Peer, Y., Willems, K.A., Verstrepen, K.J., Curtin, C.D., Lievens, B., 2015. Comparative phenomics and targeted use of genomics reveals variation in carbon and nitrogen assimilation among different *Brettanomyces bruxellensis* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 99, 9123–9134. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6769-9>
- Cuéllar-Cruz, M., Vega-González, A., Mendoza-Novelo, B., López-Romero, E., Ruiz-Baca, E., Quintanar-Escorza, M.A., Villagómez-Castro, J.C., 2012. The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31, 2513–2527. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1634-6>
- Cullen, P.J., Sprague Jr., G.F., 2012. The regulation of filamentous growth in yeast. *Genetics* 190, 23–49. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127456>
- Cullen, P.J., Sprague Jr., 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, 13619–13624. <https://doi.org/10.1073/pnas.240345197>
- Curiel, G.J., Van Eijk, H.J.M., Lelieveld, H.L.M., 2000. Risk and control of airborne contamination. *Encyclopedia of food microbiology*, Academic Press London 1816–1822.
- Curtin, C., Kennedy, E., Henschke, P.A., 2012. Genotype-dependent sulphite tolerance of Australian *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis* wine isolates. *Lett Appl Microbiol* 55, 56–61. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03257.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, e33840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033840>
- Custers, M.T.J., 1940. Onderzoekingen over het gistgeslacht *Brettanomyces*.
- Czaczyk, Myszka, 2007. Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Its Role in Microbial Biofilm Formation. Pol. J. Environ. Stud. 16, 799–806.
- D**aniels, 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. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64, 847–867. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000>
- David-Vaizant, V., Alexandre, H., 2018. Flor Yeast Diversity and Dynamics in Biologically Aged Wines. Frontiers in Microbiology 9.
- de Barros Pita, W., Teles, G.H., Peña-Moreno, I.C., da Silva, J.M., Ribeiro, K.C., de Morais Junior, M.A., 2019. The biotechnological potential of the yeast *Dekkera bruxellensis*. World J Microbiol Biotechnol 35, 103. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2678-x>
- de Barros Pita, W., Tiukova, I., Leite, F.C.B., Passoth, V., Simões, D.A., de Morais, M.A., 2013. The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. Yeast 30, 111–117. <https://doi.org/10.1002/yea.2945>
- De Bellis, D., Di Stefano, A., Simeone, P., Catitti, G., Vespa, S., Patruno, A., Marchisio, M., Mari, E., Granchi, L., Viti, C., Chiacchiarretta, P., Cichelli, A., Tofalo, R., Lanuti, P., 2022. Rapid Detection of *Brettanomyces bruxellensis* in Wine by Polychromatic Flow Cytometry. International Journal of Molecular Sciences 23, 15091. <https://doi.org/10.3390/ijms232315091>
- de Miranda, J.F., Ruiz, L.F., Silva, C.B., Uekane, T.M., Silva, K.A., Gonzalez, A.G.M., Fernandes, F.F., Lima, A.R., 2022. Kombucha: A review of substrates, regulations, composition, and biological properties. Journal of Food Science 87, 503–527. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>
- De, S., Rebnegger, C., Moser, J., Tatto, N., Graf, A.B., Mattanovich, D., Gasser, B., 2020. Pseudohyphal differentiation in *Komagataella phaffii*: Investigating the FLO gene family. FEMS Yeast Research 20. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa044>

- Deák, T., 1991. Foodborne Yeasts, in: Neidleman, S.L., Laskin, A.I. (Eds.), *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press, pp. 179–278. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70454-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70454-4)
- Delaherche, A., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2004. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and ‘ropy’ *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology* 97, 910–915. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02334.x>
- Deluchat, M., Lhomme, C., Degueurce, C., Serpaggi, V., Lacroix, R., Lebleux, M., Weidmann, S., Rousseaux, S., 2021. What kind of sanitation should be applied to remove *Brettanomyces bruxellensis* biofilms? Original language of the article: English. *IVES Technical Reviews, vine and wine*. <https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2021.4554>
- Denning, D.W., Bromley, M.J., 2015. Infectious Disease. How to bolster the antifungal pipeline. *Science* 347, 1414–1416. <https://doi.org/10.1126/science.aaa6097>
- Desai, J.V., Mitchell, A.P., Andes, D.R., 2014. Fungal biofilms, drug resistance, and recurrent infection. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4, a019729. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019729>
- Desenne, A., Maron, J.M., Jacob, J.M., 2008. Choix des récipients vinaires : incidences oenologiques et environnementales. *Lettre Actualités MATEVI*.
- Di Pilato, V., Ceccherini, F., Sennati, S., D’Agostino, F., Arena, F., D’Atanasio, N., Di Giorgio, F.P., Tongiani, S., Pallecchi, L., Rossolini, G.M., 2020. In vitro time-kill kinetics of dalbavancin against *Staphylococcus spp.* biofilms over prolonged exposure times. *Diagn Microbiol Infect Dis* 96, 114901. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114901>
- Dias, L., Dias, S., Sancho, T., Stender, H., Querol, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., 2003. Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology* 20, 567–574. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00152-1](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00152-1)
- DICKS, L.M.T., DELLAGLIO, F., COLLINS, M.D., 1995. Proposal To Reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 45, 395–397. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-2-395>
- Diesler, K., Golombek, P., Kromm, L., Scharfenberger-Schmeer, M., Durner, D., Schmarr, H.-G., Stahl, M.R., Briviba, K., Fischer, U., 2019. UV-C treatment of grape must: Microbial inactivation, toxicological considerations and influence on chemical and

- sensory properties of white wine. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 52, 291–304. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.01.005>
- Diggel, S.P., Stacey, R.E., Dodd, C., Cámara, M., Williams, P., Winzer, K., 2006. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 8, 1095–1104. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.001001.x>
- Dimopoulou, M., Kefalloniti, V., Tsakanikas, P., Papanikolaou, S., Nychas, G.-J.E., 2021. Assessing the biofilm formation capacity of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis* through ftir spectroscopy. *Microorganisms* 9, 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030587>
- Dimopoulou, M., Renault, M., Dols-Lafargue, M., Albertin, W., Herry, J.-M., Bellon-Fontaine, M.-N., Masneuf-Pomarede, I., 2019. Microbiological, biochemical, physicochemical surface properties and biofilm forming ability of *Brettanomyces bruxellensis*. *Annals of Microbiology* 69, 1217–1225. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01503-5>
- Divol, B., Lonvaud-Funel, A., 2005. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *Journal of Applied Microbiology* 99, 85–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02578.x>
- Domínguez, C., Guillén, D.A., Barroso, C.G., 2002. Determination of volatile phenols in fino sherry wines. *Analytica Chimica Acta* 458, 95–102. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01581-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01581-1)
- Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8, 881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Dray, S., Dufour, A.-B., 2007. The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *Journal of Statistical Software* 22, 1–20. <https://doi.org/10.18637/jss.v022.i04>
- Du Toit, Pretorius, 2002. The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking.
- 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, 862–871. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02549.x>
- Duarte, F.L., Coimbra, L., Baleiras-Couto, M., 2017. Filter Media Comparison for the Removal of *Brettanomyces bruxellensis* from Wine. *Am J Enol Vitic.* 68, 504–508. <https://doi.org/10.5344/ajev.2017.17003>

Dunne, W.M., 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 15, 155–166. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.155-166.2002>

Eberlein, C., Saada, O.A., Friedrich, A., Albertin, W., Schacherer, J., 2021. Different trajectories of polyploidization shape the genomic landscape of the *Brettanomyces bruxellensis* yeast species. *Genome Research* 31, 2316–2326. <https://doi.org/10.1101/gr.275380.121>

Echeverrigaray, 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 J Microbiol Biotechnol* 29, 1019–1027. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1265-9>

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, 779–789. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00521.x>

Elmowafy, E., Abdal-Hay, A., Skouras, A., Tiboni, M., Casettari, L., Guarino, V., 2019. Polyhydroxyalkanoate (PHA): applications in drug delivery and tissue engineering. *Expert Rev Med Devices* 16, 467–482. <https://doi.org/10.1080/17434440.2019.1615439>

Englezos, V., Pollon, M., Rantsiou, K., Ortiz-Julien, A., Botto, R., Río Segade, S., Giacosa, S., Rolle, L., Cocolin, L., 2019. *Saccharomyces cerevisiae*-*Starmerella bacillaris* strains interaction modulates chemical and volatile profile in red wine mixed fermentations. *Food Research International* 122, 392–401. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.072>

Faria, S.I., Teixeira-Santos, R., Romeu, M.J., Morais, J., Jong, E. de, Sjollema, J., Vasconcelos, V., Mergulhão, F.J., 2021. Unveiling the Antifouling Performance of Different Marine Surfaces and Their Effect on the Development and Structure of Cyanobacterial Biofilms. *Microorganisms* 9, 1102. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051102>

Farkas, A., Song, S., Degiuli, N., Martić, I., Demirel, Y.K., 2020. Impact of biofilm on the ship propulsion characteristics and the speed reduction. *Ocean Engineering* 199. <https://doi.org/10.1016/j.oceaneng.2020.107033>

- Fathollahi, A., Coupe, S.J., 2021. Effect of environmental and nutritional conditions on the formation of single and mixed-species biofilms and their efficiency in cadmium removal. *Chemosphere* 283, 131152. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131152>
- Faÿ, F., Hawkins, M.L., Réhel, K., Grunlan, M.A., Linossier, I., 2016. Non-toxic, anti-fouling silicones with variable PEO–silane amphiphile content. *Green Materials* 4, 53–62. <https://doi.org/10.1680/jgrma.16.00003>
- Finlay, J.A., Callow, M.E., Ista, L.K., Lopez, G.P., Callow, J.A., 2002. The influence of surface wettability on the adhesion strength of settled spores of the green alga *Enteromorpha* and the diatom *Amphora*. *Integr Comp Biol* 42, 1116–1122. <https://doi.org/10.1093/icb/42.6.1116>
- Fleet, G.H., 1993. *Wine Microbiology and Biotechnology*. CRC Press.
- Flemming, H.-C., Neu, T.R., Wozniak, D.J., 2007. The EPS matrix: the “house of biofilm cells.” *J Bacteriol* 189, 7945–7947. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H.-C., Wuertz, S., 2019. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 17, 247–260. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9>
- Floyd, K.A., Eberly, A.R., Hadjifrangiskou, M., 2017. 3 - Adhesion of bacteria to surfaces and biofilm formation on medical devices, in: Deng, Y., Lv, W. (Eds.), *Biofilms and Implantable Medical Devices*. Woodhead Publishing, pp. 47–95. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100382-4.00003-4>
- Fournier, E., Gladieux, P., Giraud, T., 2013. The ‘Dr Jekyll and Mr Hyde fungus’: noble rot versus gray mold symptoms of *Botrytis cinerea* on grapes. *Evol Appl* 6, 960–969. <https://doi.org/10.1111/eva.12079>
- Fournier, T., Gounot, J.-S., Freel, K., Cruaud, C., Lemainque, A., Aury, J.-M., Wincker, P., Schacherer, J., Friedrich, A., 2017. High-Quality de Novo Genome Assembly of the *Dekkera bruxellensis* Yeast Using Nanopore MinION Sequencing. *G3 Genes|Genomes|Genetics* 7, 3243–3250. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300128>
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H., 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research* 30, 1749–1758. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00323-1](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00323-1)
- Frøsig, M.M., Costa, S.R., Liesche, J., Østerberg, J.T., Hanisch, S., Nintemann, S., Sørensen, H., Palmgren, M., Pomorski, T.G., López-Marqués, R.L., 2020. Pseudohyphal growth

- in *Saccharomyces cerevisiae* involves protein kinase-regulated lipid flippases. *Journal of Cell Science* 133. <https://doi.org/10.1242/jcs.235994>
- Fugelsang, K.C., 1997. *Wine Microbiology*. Springer US, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6970-8>
- Fugelsang, K.C., Edwards, C.G., 2007. *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. Springer Science & Business Media.
- FURUKAWA, S., NOJIMA, N., YOSHIDA, K., HIRAYAMA, S., OGIHARA, H., MORINAGA, Y., 2011. The Importance of Inter-Species Cell-Cell Co-Aggregation between *Lactobacillus plantarum* ML11-11 and *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 in Mixed-Species Biofilm Formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75, 1430–1434. <https://doi.org/10.1271/bbb.100817>
- G**alafassi, S., Merico, A., Pizza, F., Hellborg, L., Molinari, F., Piškur, J., Compagno, C., 2011. *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38, 1079–1088. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0885-4>
- Gammacurta, M., Marchand, S., Moine, V., de Revel, G., 2017. Influence of different yeast/lactic acid bacteria combinations on the aromatic profile of red Bordeaux wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97, 4046–4057. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8272>
- Gammacurta, M., Waffo-Teguo, P., Winstel, D., Cretin, B.N., Sindt, L., Dubourdieu, D., Marchal, A., 2019. Triterpenoids from *Quercus petraea*: Identification in Wines and Spirits and Sensory Assessment. *J Nat Prod* 82, 265–275. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00682>
- Gancedo, J.M., 2001. Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 25, 107–123. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00573.x>
- 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, 141–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.014>
- Gattlen, J., Zinn, M., Guimond, S., Körner, E., Amberg, C., Mauclair, L., 2011. Biofilm formation by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: process, repeatability and cell attachment in a continuous biofilm reactor. *Biofouling* 27, 979–991. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.619657>

- Genin, S.N., Stewart Aitchison, J., Grant Allen, D., 2014. Design of algal film photobioreactors: material surface energy effects on algal film productivity, colonization and lipid content. *Bioresour Technol* 155, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.060>
- Gillet, G., Azemar, F., Faÿ, F., Réhel, K., Linossier, I., 2018. Non-Leachable Hydrophilic Additives for Amphiphilic Coatings. *Polymers* 10, 445. <https://doi.org/10.3390/polym10040445>
- Ginjom, I., D’Arcy, B., Caffin, N., Gidley, M., 2011. Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process. *Food Chemistry* 125, 823–834. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.062>
- Gonçalves, B., Fernandes, L., Henriques, M., Silva, S., 2020. Environmental pH modulates biofilm formation and matrix composition in *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling* 621–630. <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1793963>
- González, B., Mas, A., Beltran, G., Cullen, P.J., Torija, M.J., 2017. Role of mitochondrial retrograde pathway in regulating ethanol-inducible filamentous growth in yeast. *Frontiers in Physiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00148>
- González, B., Vázquez, J., Cullen, P.J., Mas, A., Beltran, G., Torija, M.-J., 2018. Aromatic amino acid-derived compounds induce morphological changes and modulate the cell growth of wine yeast species. *Frontiers in Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00670>
- Gosset, M., Roques, C., Taillandier, P., 2022. Microbial biofilms in oenology. *OENO One* 56, 167–184. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2022.56.3.5537>
- Goto, S., Takayama, K., Shinohara, T., 1989. Occurrence of molds in wine storage cellars. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 68, 230–232. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(89\)90020-2](https://doi.org/10.1016/0922-338X(89)90020-2)
- Gounot, J.-S., Neuvéglise, C., Freil, K.C., Devillers, H., Piškur, J., Friedrich, A., Schacherer, J., 2020. High complexity and degree of genetic variation in *Brettanomyces bruxellensis* population. *Genome Biology and Evolution* 12, 795–807. <https://doi.org/10.1093/GBE/EVAA077>
- Govender, P., Bester, M., Bauer, F.F., 2010. FLO gene-dependent phenotypes in industrial wine yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86, 931–945. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2381-1>
- Grbin, P.R., Henschke, P.A., 2000. Mousy off-flavour production in grape juice and wine by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeasts. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 6, 255–262. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2000.tb00186.x>

- Gross, M., Zhao, X., Mascarenhas, V., Wen, Z., 2016. Effects of the surface physico-chemical properties and the surface textures on the initial colonization and the attached growth in algal biofilm. *Biotechnol Biofuels* 9, 38. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0451-z>
- Guenec, A., Brelle, L., Balnois, E., Linossier, I., Renard, E., Langlois, V., Faÿ, F., Chen, G.Q., Simon-Colin, C., Vallée-Réhel, K., 2021. Antifouling properties of amphiphilic poly(3-hydroxyalkanoate): an environmentally-friendly coating. *Biofouling* 37, 894–910. <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1981298>
- Guilhen, C., Charbonnel, N., Parisot, N., Gueguen, N., Iltis, A., Forestier, C., Balestrino, D., 2016. Transcriptional profiling of *Klebsiella pneumoniae* defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells. *BMC Genomics* 17, 237. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2557-x>
- Guo, B., Styles, C.A., Feng, Q., Fink, G.R., 2000. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12158–12163. <https://doi.org/10.1073/pnas.220420397>
- Guo, S., Vance, T.D.R., Zahiri, H., Eves, R., Stevens, C., Hehemann, J.-H., Vidal-Melgosa, S., Davies, P.L., 2021. Structural Basis of Ligand Selectivity by a Bacterial Adhesin Lectin Involved in Multispecies Biofilm Formation. *mBio* 12, e00130-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.00130-21>
- H**Haas, D., Galler, H., Habib, J., Melkes, A., Schlacher, R., Buzina, W., Friedl, H., Marth, E., Reinthaler, F.F., 2010. Concentrations of viable airborne fungal spores and trichloroanisole in wine cellars. *International Journal of Food Microbiology*, The 16th CBL (Club des Bactéries Lactiques) Symposium, May 2009, Toulouse, France 144, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.008>
- Haidar, R., 2016. Antoni van Leeuwenhoek. *Photoniques* 19–24. <https://doi.org/10.1051/photon/20168217>
- Halan, B., Buehler, K., Schmid, A., 2012. Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. *Trends in Biotechnology* 30, 453–465. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.05.003>
- Halder, S., Yadav, K.K., Sarkar, R., Mukherjee, S., Saha, P., Halder, S., Karmakar, S., Sen, T., 2015. Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents. *SpringerPlus* 4, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1476-7>

- 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>
- Harding, M.W., Marques, L.L.R., Howard, R.J., Olson, M.E., 2009. Can filamentous fungi form biofilms? *Trends Microbiol* 17, 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.08.007>
- Harrison, K., Curtin, C., 2021. Microbial Composition of SCOBY Starter Cultures Used by Commercial Kombucha Brewers in North America. *Microorganisms* 9, 1060. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051060>
- Harrouard, J., Eberlein, C., Ballestra, P., Dols-Lafargue, M., Masneuf-Pomarede, I., Miot-Sertier, C., Schacherer, J., Albertin, W., 2022. *Brettanomyces bruxellensis*: Overview of the genetic and phenotypic diversity of an anthropized yeast. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/mec.16439>
- Harrouard, J., Pilard, E., Miot-Sertier, C., Pouget, L., Marullo, P., Ferrari, G., Pataro, G., Ghidossi, R., Albertin, W., 2023. Evaluating the influence of operational parameters of pulsed light on wine related yeasts: focus on inter- and intra-specific variability sensitivity. *Food Microbiology* 109, 104121. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104121>
- Hassan, Al-Alaq, n.d. Correlation Between Cell Surface Adhesins Genes and Biofilm Formation in *Streptococcus mutans* Bacteria Isolated from Dental Caries | HIV Nursing [WWW Document]. URL <https://www.hivnursing.net/index.php/hiv/article/view/1163> (accessed 1.19.23).
- Hellborg, L., Piškur, J., 2009. Complex Nature of the Genome in a Wine Spoilage Yeast, *Dekkera bruxellensis*. *Eukaryot Cell* 8, 1739–1749. <https://doi.org/10.1128/EC.00115-09>
- Henrici, A.T., 1933. Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. *J Bacteriol* 25, 277–287. <https://doi.org/10.1128/jb.25.3.277-287.1933>
- Heredia, F.J., Escudero-Gilete, M.L., Hernanz, D., Gordillo, B., Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M., González-Miret, M.L., 2010. Influence of the refrigeration technique on the colour and phenolic composition of syrah red wines obtained by pre-fermentative cold maceration. *Food Chemistry* 118, 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.132>
- Heresztyn, T., 1986. Formation of Substituted Tetrahydropyridines by Species of *Brettanomyces* and *Lactobacillus* Isolated from Mousy Wines. *Am J Enol Vitic.* 37, 127–132. <https://doi.org/10.5344/ajev.1986.37.2.127>

- Hilbert, L.R., Bagge-Ravn, D., Kold, J., Gram, L., 2003. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation* 52, 175–185. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00104-5](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00104-5)
- Hogan, D.A., 2006. Talking to Themselves: Autoregulation and Quorum Sensing in Fungi. *Eukaryotic Cell* 5, 613–619. <https://doi.org/10.1128/EC.5.4.613-619.2006>
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O., 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35, 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>
- Holt, S., Mukherjee, V., Lievens, B., Verstrepen, K.J., Thevelein, J.M., 2018. Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. *Food Microbiol* 72, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.008>
- Homero, U., Tortella, G., Sandoval, E., Cuozzo, S.A., 2021. Extracellular Polymeric Substances (EPS) produced by *Streptomyces spp.* biofilms: Chemical composition and anticancer properties. *Microbiological Research* 253, 126877. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126877>
- Hong, Y., Brown, D.G., 2010. Alteration of bacterial surface electrostatic potential and pH upon adhesion to a solid surface and impacts to cellular bioenergetics. *Biotechnology and Bioengineering* 105, 965–972. <https://doi.org/10.1002/bit.22606>
- Huffnagle, G.B., Noverr, M.C., 2013. The emerging world of the fungal microbiome. *Trends Microbiol* 21, 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.04.002>
- Lurie, Y., O’toole, G.A., Yuk, M.H., 2005. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 250, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.07.012>
- Ishchuk, O.P., Zeljko, T.V., Schifferdecker, A.J., Wisén, S.M., Hagström, Å.K., Rozpędowska, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161741>
- Ito, A., Taniuchi, A., May, T., Kawata, K., Okabe, S., 2009. Increased Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* in Mature Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 4093–4100. <https://doi.org/10.1128/AEM.02949-08>
- ITV-France, 2006. Itinéraires les cahiers d itv France *Brettanomyces* et phénols volatils Prévenir et limiter les altérations [WWW Document]. URL

<https://docplayer.fr/113143818-Itinéraires-les-cahiers-d-itv-france-brettanomyces-et-phenols-volatils-prevenir-et-limiter-les-alterations-n-12-juillet-2006.html> (accessed 3.18.23).

Janssen, D.E., 1991. An immobilized cell bioreactor for the malolactic fermentation of wine : a thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Technology in Biotechnology at Massey University (Thesis). Massey University.

Jayabalan, R., Malbaša, R.V., Lončar, E.S., Vitas, J.S., Sathishkumar, M., 2014. A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13, 538–550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>

Joseph, C.M.L., Gorton, L.W., Ebeler, S.E., Bisson, L.F., 2013. Production of Volatile Compounds by Wine Strains of *Brettanomyces bruxellensis* Grown in the Presence of Different Precursor Substrates. *Am J Enol Vitic.* 64, 231–240. <https://doi.org/10.5344/ajev.2013.12095>

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. <https://doi.org/10.5344/ajev.2007.58.3.373>

Kang, Q., Appels, L., Tan, T., Dewil, R., 2014. Bioethanol from Lignocellulosic Biomass: Current Findings Determine Research Priorities. *The Scientific World Journal* 2014, e298153. <https://doi.org/10.1155/2014/298153>

Kawarai, T., Furukawa, S., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2007. Mixed-Species Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Rice Wine Yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4673–4676. <https://doi.org/10.1128/AEM.02891-06>

Kaye, K.S., Petty, L.A., Shorr, A.F., Zilberberg, M.D., 2019. Current Epidemiology, Etiology, and Burden of Acute Skin Infections in the United States. *Clin Infect Dis* 68, S193–S199. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz002>

Klis, F.M., Boorsma, A., De Groot, P.W.J., 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 185–202. <https://doi.org/10.1002/yea.1349>

Knowles, E.J., Castenholz, R.W., 2008. Effect of exogenous extracellular polysaccharides on the desiccation and freezing tolerance of rock-inhabiting phototrophic microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol* 66, 261–270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00568.x>

- Kolter, R., Greenberg, E.P., 2006. Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature* 441, 300–302. <https://doi.org/10.1038/441300a>
- Kregiel, D., James, S.A., Rygala, A., Berlowska, 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>
- Krsmanovic, M., Biswas, D., Ali, H., Kumar, A., Ghosh, R., Dickerson, A.K., 2021. Hydrodynamics and surface properties influence biofilm proliferation. *Advances in Colloid and Interface Science* 288. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102336>
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., Uchiyama, H., 2008. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *J Biosci Bioeng* 106, 381–386. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.381>
- Kukhtyn, M., Kravcheniuk, K., Beyko, L., Horiuk, Y., Skliar, O., Kernychnyi, S., 2019. Modeling the process of microbial biofilm formation on stainless steel with a different surface roughness. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies* 2, 14–21. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2019.160142>
- Kumara, H.M., De Cort, S., Verachtert, H., 1993. Localization and Characterization of alpha-Glucosidase Activity in *Brettanomyces lambicus*. *Appl Environ Microbiol* 59, 2352–2358. <https://doi.org/10.1128/aem.59.8.2352-2358.1993>
- Kumara, H.M.C.S., Verachtert, H., 1991. Identification of Lambic Superattenuating Micro-Organisms by the Use of Selective Antibiotics. *Journal of the Institute of Brewing* 97, 181–185. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1991.tb01064.x>
- Kumari, A., Mankotia, S., Chaubey, B., Luthra, M., Singh, R. 2018, n.d. Role of biofilm morphology, matrix content and surface hydrophobicity in the biofilm-forming capacity of various *Candida species*. *Journal of Medical Microbiology* 67, 889–892. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000747>
- Laitila, A., Sarlin, T., Raulio, M., Wilhelmson, A., Kotaviita, E., Huttunen, T., Juvonen, R., 2011. Yeasts in malting, with special emphasis on *Wickerhamomyces anomalus* (synonym *Pichia anomala*). *Antonie Van Leeuwenhoek* 99, 75–84. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9511-8>
- Lambrechts, M.G., Bauer, F.F., Marmur, J., Pretorius, I.S., 1996. MUC1, a mucin-like protein that is regulated by MSS10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8419–8424. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8419>

- Lattey, K. a., Bramley, B. r., Francis, I. l., 2010. Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16, 189–202. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00069.x>
- Lavaisse, L.M., Hollmann, A., Nazareno, M.A., Disalvo, E.A., 2019. Zeta potential changes of *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and respiratory cycles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 174, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.001>
- Lebleux, M., Abdo, H., Coelho, C., Basmaciyan, L., Albertin, W., Maupeu, J., Laurent, J., Roullier-Gall, C., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., Weidmann, S., Rousseaux, S., 2020. New advances on the *Brettanomyces bruxellensis* biofilm mode of life. *International Journal of Food Microbiology* 318. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108464>
- Lebleux, M., Denimal, E., De Oliveira, D., Marin, A., Desroche, N., Alexandre, H., Weidmann, S., Rousseaux, S., 2021. Prediction of Genetic Groups within *Brettanomyces bruxellensis* through Cell Morphology Using a Deep Learning Tool. *Journal of Fungi* 7, 581. <https://doi.org/10.3390/jof7080581>
- Legras, J.-L., Moreno-Garcia, J., Zara, S., Zara, G., Garcia-Martinez, T., Mauricio, J.C., Mannazzu, I., Coi, A.L., Bou Zeidan, M., Dequin, S., Moreno, J., Budroni, M., 2016. Flor Yeast: New Perspectives Beyond Wine Aging. *Frontiers in Microbiology* 7.
- Leite, F.C.B., Basso, T.O., Pita, W. de B., Gombert, A.K., Simões, D.A., de Morais, M.A., 2013. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. *FEMS Yeast Res* 13, 34–43. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12007>
- Lenhart, B.A., Meeks, B., Murphy, H.A., 2019. Variation in filamentous growth and response to quorum-sensing compounds in environmental isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 9, 1533–1544. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400080>
- Liang, X., Peng, L.-H., Zhang, S., Zhou, S., Yoshida, A., Osatomi, K., Bellou, N., Guo, X.-P., Dobretsov, S., Yang, J.-L., 2019. Polyurethane, epoxy resin and polydimethylsiloxane altered biofilm formation and mussel settlement. *Chemosphere* 218, 599–608. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.120>
- Licker, J., Acree, T., Henick-Kling, T., 1998. What Is “Brett” (Brettanomyces) Flavor?: A Preliminary Investigation. *ACS Symposium Series* 714, 96–115. <https://doi.org/10.1021/bk-1998-0714.ch008>

- Liu, Y., Liu, G., Liu, G., Kang, L., 2023. Impact of Environmental Conditions on the Biofilm Formation of *Pseudomonas lundensis*. *Science and Technology of Food Industry* 44, 122–128. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022030335>
- 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, 856–873. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.983591>
- Lo, W.-S., Raitses, E.I., Dranginis, A.M., 1997. Development of pseudohyphae by embedded haploid and diploid yeast. *Curr Genet* 32, 197–202. <https://doi.org/10.1007/s002940050266>
- Longin, C., 2016. Development of methods for the detection and quantification of spoilage microorganisms in wine: study of growing factors (phdthesis). Université de Bourgogne.
- Longin, C., Degueurce, C., Julliat, F., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., Alexandre, H., 2016a. 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>
- Longin, C., Julliat, F., Serpaggi, V., Maupeu, J., Bourbon, G., Rousseaux, S., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H., 2016b. Evaluation of three *Brettanomyces* qPCR commercial kits: results from an interlaboratory study. *OENO One* 50. <https://doi.org/10.20870/oenone.2016.50.4.1274>
- Lonvaud-Funel, A., 2016. Undesirable compounds and spoilage microorganisms in wine, in: *Wine Safety, Consumer Preference, and Human Health*. pp. 3–26. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24514-0_1
- Lonvaud-Funel, A., 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 317–331.
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2006. 13 - *Dekkera/Brettanomyces spp.*, in: Blackburn, C. de W. (Ed.), *Food Spoilage Microorganisms*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, pp. 354–398. <https://doi.org/10.1533/9781845691417.3.354>
- Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M., 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int J Food Microbiol* 86, 23–50. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00246-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00246-0)
- Louw, M., du Toit, M., 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>
- Lowes, K.F., Shearman, C.A., Payne, J., MacKenzie, D., Archer, D.B., Merry, R.J., Gasson, M.J., 2000. Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1066–1076. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.1066-1076.2000>
- Lynd, L.R., 2017. The grand challenge of cellulosic biofuels. *Nat Biotechnol* 35, 912–915. <https://doi.org/10.1038/nbt.3976>
- M**_a, A., Neumann, N., Chui, L., 2021. Phenotypic and Genetic Determination of Biofilm Formation in Heat Resistant *Escherichia coli* Possessing the Locus of Heat Resistance. *Microorganisms* 9, 403. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020403>
- Ma, C., Zhang, W., Zhang, G., Qian, P.-Y., 2017. Environmentally Friendly Antifouling Coatings Based on Biodegradable Polymer and Natural Antifoulant. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* 5, 6304–6309. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01385>
- Macfarlane, S., Dillon, J.F., 2007. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 102, 1187–1196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03287.x>
- Mack, W.N., Mack, J.P., Ackerson, A.O., 1975. Microbial film development in a trickling filter. *Microb Ecol* 2, 215–226. <https://doi.org/10.1007/BF02010441>
- Malbaša, R., Lončar, E., Vitas, J., Čanadanović-Brunet, J., 2011. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry* 127, 1727–1731. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.048>
- Mamudu, A., Olukanmi, T., 2019. Effects of chemical and biological pretreatment method on sugarcane bagasse for bioethanol production. *International Journal of Civil Engineering and Technology* 10, 2613–2623.
- Mandl, K., Schattauer, D., Geyrhofer, A., Weingartmann, H., 2010. Biodiversity of fungal microflora in wine-cellars. *Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Fruchteverwertung* 60, 350–354.
- Manecka, G.M., Labrash, J., Rouxel, O., Dubot, P., Lalevée, J., Andaloussi, S.A., Renard, E., Langlois, V., Versace, D.L., 2014. Green Photoinduced Modification of Natural Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Surface for Antibacterial Applications. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2, 996–1006. <https://doi.org/10.1021/sc400564r>

- Marquès, C., Tasse, J., Pracros, A., Collin, V., Franceschi, C., Laurent, F., Chatellier, S., Forestier, C., 2015. Effects of antibiotics on biofilm and unattached cells of a clinical *Staphylococcus aureus* isolate from bone and joint infection. *J Med Microbiol* 64, 1021–1026. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000125>
- Marsh, A.J., O’Sullivan, O., Hill, C., Ross, R.P., Cotter, P.D., 2014. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiol* 38, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>
- Martínez, P., Valcárcel, M.J., Piérez, L., Benítez, T., 1998. Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* Flor Yeasts During Fermentation and Biological Aging of Fino Sherry: By-products and Aroma Compounds. *Am J Enol Vitic.* 49, 240–250. <https://doi.org/10.5344/ajev.1998.49.3.240>
- 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. *Int J Food Microbiol* 106, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.014>
- Martyniak, B., Bolton, J., Kuksin, D., Shahin, S.M., Chan, L.L.-Y., 2017. A novel concentration and viability detection method for *Brettanomyces* using the Cellometer image cytometry. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 44, 119–128. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1861-4>
- Mas, P., Tran, T., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., Grandvalet, C., Tourdot-Maréchal, R., 2022. Evolution in Composition of Kombucha Consortia over Three Consecutive Years in Production Context. *Foods* 11, 614. <https://doi.org/10.3390/foods11040614>
- Mauclair, L., Brombacher, E., Bünger, J.D., Zinn, M., 2010. Factors controlling bacterial attachment and biofilm formation on medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs). *Colloids Surf B Biointerfaces* 76, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.021>
- Medilanski, E., Kaufmann, K., Wick, L.Y., Wanner, O., Harms, H., 2002. Influence of the surface topography of stainless steel on bacterial adhesion. *Biofouling* 193–203. <https://doi.org/10.1080/08927010290011370>
- Mehlomakulu, N.N., Prior, K.J., Setati, M.E., Divol, B., 2017. *Candida pyralidae* killer toxin disrupts the cell wall of *Brettanomyces bruxellensis* in red grape juice. *Journal of Applied Microbiology* 122, 747–758. <https://doi.org/10.1111/jam.13383>
- Mehlomakulu, N.N., Setati, M.E., Divol, B., 2014. Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces*

- spp.* International Journal of Food Microbiology 188, 83–91.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.015>
- Mempel, M., Schmidt, T., Weidinger, S., Schnopp, C., Ring, J., Abeck, D., Foster, T., 1998. Role of Staphylococcus Aureus Surface-Associated Proteins in the Attachment to Cultured HaCaT *Keratinocytes* in a New Adhesion Assay. Journal of Investigative Dermatology 111, 452–456. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00293.x>
- Mendiburu, F. de, 2021. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research.
- Michel, C., Garrido, Francis, Roche, Emilie, Challan Belval, Sylvain, Dictor, Marie-Christine, 2011. Role of Exopolymeric Substances (EPS) in the Stability of the Biofilm of *Thiomonas arsenivorans* Grown on a Porous Mineral Support. J. Microbiol. Biotechnol. 21, 183–186. <https://doi.org/10.4014/jmb.1001.01017>
- Mierczynska-Vasilev, A., Smith, P.A., 2015. Current state of knowledge and challenges in wine clarification. Australian Journal of Grape and Wine Research 21, 615–626. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12198>
- Miki, B.L., Poon, N.H., James, A.P., Seligy, V.L., 1982. Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology 150, 878–889. <https://doi.org/10.1128/jb.150.2.878-889.1982>
- Miljić, U., Puškaš, V., Vučurović, V., Muzalevski, A., 2017. Fermentation Characteristics and Aromatic Profile of Plum Wines Produced with Indigenous Microbiota and Pure Cultures of Selected Yeast. Journal of Food Science 82, 1443–1450. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13736>
- Millet, V., Lonvaud-Funel, A., 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. Letters in Applied Microbiology 30, 136–141. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00684.x>
- Mitchell, K.F., Zarnowski, R., Andes, D.R., 2016. The Extracellular Matrix of Fungal Biofilms. Adv Exp Med Biol 931, 21–35. https://doi.org/10.1007/5584_2016_6
- Mitri, S., Richard Foster, K., 2013. The Genotypic View of Social Interactions in Microbial Communities. Annual Review of Genetics 47, 247–273. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-111212-133307>
- Moreno-García, J., Mauricio, J.C., Moreno, J., García-Martínez, T., 2017. Differential proteome analysis of a flor yeast strain under biofilm formation. International Journal of Molecular Sciences 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18040720>

- Morneau, A. d., Zuehlke, J. m., Edwards, C. g., 2011. Comparison of media formulations used to selectively cultivate *Dekkera/Brettanomyces*. Letters in Applied Microbiology 53, 460–465. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03133.x>
- Mortensen, H. d., Dupont, K., Jespersen, L., Willats, W. g. t., Arneborg, N., 2007. Identification of amino acids involved in the Flo11p-mediated adhesion of *Saccharomyces cerevisiae* to a polystyrene surface using phage display with competitive elution. Journal of Applied Microbiology 103, 1041–1047. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03325.x>
- Mortimer, R., Polsinelli, M., 1999. On the origins of wine yeast. Res Microbiol 150, 199–204. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(99\)80036-9](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(99)80036-9)
- Nadai, C., Giacomini, A., Corich, V., 2021. The addition of wine yeast *Starmerella bacillaris* to grape skin surface influences must fermentation and glycerol production. Oeno One 55, 47–55. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.2.4556>
- Navarathna, D.H.M.L.P., Pathirana, R.U., Lionakis, M.S., Nickerson, K.W., Roberts, D.D., 2016. *Candida albicans* ISW2 Regulates Chlamyospore 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>
- Negri, S., Lovato, A., Boscaini, F., Salvetti, E., Torriani, S., Commisso, M., Danzi, R., Ugliano, M., Polverari, A., Tornielli, G.B., Guzzo, F., 2017. The Induction of Noble Rot (*Botrytis cinerea*) Infection during Postharvest Withering Changes the Metabolome of Grapevine Berries (*Vitis vinifera* L., cv. Garganega). Frontiers in Plant Science 8.
- Nett, J., Andes, D., 2006a. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. Curr Opin Microbiol 9, 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.007>
- Nett, J., Andes, D., 2006b. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. Current Opinion in Microbiology, Host microbe interactions: fungi/Host microbe interactions: parasites/Host microbe interactions: viruses 9, 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.007>
- Ngo, B.K.D., Grunlan, M.A., 2017. Protein Resistant Polymeric Biomaterials. ACS Macro Lett. 6, 992–1000. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.7b00448>
- Nickerson, K.W., Atkin, A.L., Hornby, J.M., 2006. Quorum Sensing in Dimorphic Fungi: Farnesol and Beyond. Applied and Environmental Microbiology 72, 3805–3813. <https://doi.org/10.1128/AEM.02765-05>

- Ocón, E., Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Olarte, C., Gutiérrez, A.R., Sanz, S., 2013a. Comparison of culture media for the recovery of airborne yeast in wineries. *Lett Appl Microbiol* 57, 241–248. <https://doi.org/10.1111/lam.12103>
- Ocón, E., Garijo, P., Sanz, S., Olarte, C., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R., 2013b. Analysis of airborne yeast in one winery over a period of one year. *Food Control* 30, 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 Microbiol* 27, 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, M169–M174. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02097.x>
- Oelofse, A., Lonvaud-Funel, A., du Toit, M., 2009. Molecular identification of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from red wines and volatile phenol production. *Food Microbiol* 26, 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.10.011>
- Oelofse, A., Pretorius, I.S., du Toit, M., 2008. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking: A Synoptic Review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 29, 128–144.
- Oliva, A., Stefani, S., Venditti, M., Di Domenico, E.G., 2021. Biofilm-Related Infections in Gram-Positive Bacteria and the Potential Role of the Long-Acting Agent Dalbavancin. *Frontiers in Microbiology* 12.
- Oliveira, N.M., Martinez-Garcia, E., Xavier, J., Durham, W.M., Kolter, R., Kim, W., Foster, K.R., 2015. Biofilm Formation As a Response to Ecological Competition. *PLOS Biology* 13, e1002191. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002191>
- 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.
- Oswald, T.A., Edwards, C.G., 2017. Interactions between storage temperature and ethanol that affect growth of *Brettanomyces bruxellensis* in merlot wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 68, 188–194. <https://doi.org/10.5344/ajev.2017.16102>
- O’Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54, 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>

O'Toole, G.A., 2016. Classic Spotlight: Before They Were Biofilms. *J Bacteriol* 198, 5–5.
<https://doi.org/10.1128/JB.00593-15>

Pannella, G., Lombardi, S.J., Coppola, F., Vergalito, F., Iorizzo, M., Succi, M., Tremonte, P.,

Iannini, C., Sorrentino, E., Coppola, R., 2020. Effect of Biofilm Formation by *Lactobacillus plantarum* on the Malolactic Fermentation in Model Wine. *Foods* 9, 797.
<https://doi.org/10.3390/foods9060797>

Parente, D.C., Cajueiro, D.B.B., Moreno, I.C.P., Leite, F.C.B., De Barros Pita, W., De Morais Jr, M.A., 2018. On the catabolism of amino acids in the yeast *Dekkera bruxellensis* and the implications for industrial fermentation processes. *Yeast* 35, 299–309.
<https://doi.org/10.1002/yea.3290>

Park, Y.-N., Srikantha, T., Daniels, K.J., Jacob, M.R., Agarwal, A.K., Li, X.-C., 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>

Paulin, M., Miot-Sertier, C., Dutilh, L., Brasselet, C., Delattre, C., Pierre, G., Dubessay, P., Michaud, P., Doco, T., Ballestra, P., Albertin, W., Masneuf-Pomarède, I., Moine, V., Coulon, J., Vallet-Courbin, A., Maupeu, J., Dols-Lafargue, M., 2020. *Brettanomyces bruxellensis* Displays Variable Susceptibility to Chitosan Treatment in Wine. *Frontiers in Microbiology* 11.

Percival, S.L., Malic, S., Cruz, H., Williams, D.W., 2011. Introduction to Biofilms, in: Percival, S., Knottenbelt, D., Cochrane, C. (Eds.), *Biofilms and Veterinary Medicine*, Springer Series on Biofilms. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 41–68.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-21289-5_2

Pereira, S., Zille, A., Micheletti, E., Moradas-Ferreira, P., De Philippis, R., Tamagnini, P., 2009. Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly. *FEMS Microbiol Rev* 33, 917–941. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00183.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>

- Perpetuini, G., Rossetti, A.P., Battistelli, N., Arfelli, G., Tofalo, R., 2021. Adhesion properties, biofilm forming potential, and susceptibility to disinfectants of contaminant wine yeasts. *Microorganisms* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030654>
- Perpetuini, Giorgia, Rossetti, A.P., Tittarelli, F., Battistelli, N., Arfelli, G., Suzzi, G., Tofalo, R., 2021. Promoting *Candida zemplinina* adhesion on oak chips: A strategy to enhance esters and glycerol content of Montepulciano d’Abruzzo organic wines. *Food Research International* 150, 110772. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110772>
- Perpetuini, G., Tittarelli, F., Suzzi, G., Tofalo, R., 2019. Cell Wall Surface Properties of *Kluyveromyces marxianus* Strains From Dairy-Products. *Frontiers in Microbiology* 10.
- Peynaud, E., 1959. Les problèmes microbiologiques de la vinification et de la conservation des vins blancs doux. *Vignes Vins* 54 8–12.
- Peynaud, E., Domercq, S., 1956. Sur les *Brettanomyces* isolés de raisins et de vins. *Archiv. Mikrobiol.* 24, 266–280. <https://doi.org/10.1007/BF00419012>
- Pierce, C.G., Vila, T., Romo, J.A., Montelongo-Jauregui, D., Wall, G., Ramasubramanian, A., Lopez-Ribot, J.L., 2017. The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. *Journal of Fungi* 3, 14. <https://doi.org/10.3390/jof3010014>
- Pilard, E., Harrouard, J., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Albertin, W., Ghidossi, R., 2021. Wine yeast species show strong inter- and intra-specific variability in their sensitivity to ultraviolet radiation. *Food Microbiology* 100, 103864. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103864>
- Piola, R., Dafforn, K., Johnston, E., 2009. The influence of antifouling practices on marine invasions. *Biofouling* 25, 633–644. <https://doi.org/10.1080/08927010903322065>
- Piškur, J., Ling, Z., Marcet-Houben, M., Ishchuk, O.P., Aerts, A., LaButti, K., Copeland, A., Lindquist, E., Barry, K., Compagno, C., Bisson, L., Grigoriev, I.V., Gabaldón, T., Phister, T., 2012. The genome of wine yeast *Dekkera bruxellensis* provides a tool to explore its food-related properties. *Int J Food Microbiol* 157, 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.008>
- Piškur, J., Rozpędowska, E., Polakova, S., Merico, A., Compagno, C., 2006. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics* 22, 183–186. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.02.002>
- Polvi, E.J., Li, X., O’Meara, T.R., Leach, M.D., Cowen, L.E., 2015. Opportunistic yeast pathogens: reservoirs, virulence mechanisms, and therapeutic strategies. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 2261–2287. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1860-z>

- Porru, C., Rodríguez-Gómez, F., Benítez-Cabello, A., Jiménez-Díaz, R., Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., Arroyo-López, F.N., 2018. Genotyping, identification and multifunctional features of yeasts associated to Bosana naturally black table olive fermentations. *Food Microbiology* 69, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.010>
- Porter, J.R., 1976. Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriol Rev* 40, 260–269.
- Poupault, 2015. Caractérisation des phénomènes de bio-adhésion à l'origine des altérations des vins. roceedings of the 10th International Symposium of Enology of Bordeaux. *Vigne et vin publications internationales* 234–237.
- Pretorius, I.S., Van der Westhuizen, T.J., Augustyn, O.P.H., 1999. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African Wine Industry. A review. *South African Journal of Enology and Viticulture (South Africa)*.
- R**aut, J.S., Doke, S.K., Karuppayil, S.M., 2017. Yeast Biofilms in the Context of Human Health and Disease, in: Satyanarayana, T., Kunze, G. (Eds.), *Yeast Diversity in Human Welfare*. Springer, Singapore, pp. 137–162. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2621-8_6
- Raut, J.S., Shinde, R.B., Chauhan, N.M., Karuppayil, S.M., 2014. Phenylpropanoids of Plant Origin as Inhibitors of Biofilm Formation by *Candida albicans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 1216–1225. <https://doi.org/10.4014/jmb.1402.02056>
- Reis, A.L.S., de Fátima Rodrigues de Souza, R., Baptista Torres, R.R.N., Leite, F.C.B., Paiva, P.M.G., Vidal, E.E., de Morais, M.A., 2014. Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain. *Springerplus* 3, 38. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-38>
- Reis, V.R., Bassi, A.P.G., Silva, J.C.G. da, Ceccato-Antonini, S.R., 2013. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. *Braz. J. Microbiol.* 44, 1121–1131. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000020>
- Reisner, A., Höller, B.M., Molin, S., Zechner, E.L., 2006. Synergistic Effects in Mixed *Escherichia coli* Biofilms: Conjugative Plasmid Transfer Drives Biofilm Expansion. *Journal of Bacteriology* 188, 3582–3588. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3582-3588.2006>

- Renouf, (Renouf, V., Claisse, Claisse, O., Lonvaud-Funel, Lonvaud-Funel, A., 2005. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. AUSTRALIAN JOURNAL OF GRAPE AND WINE RESEARCH 11, 316–327. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00031.x>
- Renouf, V., 2015. *Brettanomyces* et phénols volatils: Outils pratiques pour prévenir et limiter les altérations dans les vins. Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- Renouf, V., 2006. Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : Interactions et équilibres – Relation avec la qualité du Vin (phd).
- Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., 2007. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. Appl Microbiol Biotechnol 75, 149–164. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0798-3>
- Renouf, V., Claisse, O., Miot-Sertier, C., Perello, M.-C., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2006a. Study of the microbial ecosystem present on the barrels surface used during the winemaking. Sciences des Aliments 26, 427–445. <https://doi.org/10.3166/sda.26.427-445>
- Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M.C., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A., 2006b. 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., Lonvaud-Funel, A., 2007. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. Microbiological Research 162, 154–167. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.02.006>
- Renouf, Vincent, 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>
- Reva, O.N., Zaets, I.E., Ovcharenko, L.P., Kukhareno, O.E., Shpylova, S.P., Podolich, O.V., de Vera, J.-P., Kozyrovska, N.O., 2015. Metabarcoding of the kombucha microbial community grown in different microenvironments. AMB Express 5, 124. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0124-5>
- Reynolds, T.B., Fink, G.R., 2001. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. Science 291, 878–881. <https://doi.org/10.1126/science.291.5505.878>

- Ribereau-Gayon, J., Ribereau-Gayon, P., Sudraud, P., Peynaud, E., 1977. Sciences et techniques du vin, 4. Clarification et stabilisation, matériels et installations. Dunod, Paris.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., 2020. Traité d'oenologie - Tome 1 - 7e éd.: Microbiologie du vin. Vinifications, 7e édition. ed. Dunod.
- Richards, J.J., Melander, C., 2009. Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem* 10, 2287–2294. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900317>
- Riedl, R., Fütterer, J., Goderbauer, P., Michel, M., Jacob, F., Hutzler, M., 2019. Combined Yeast Biofilm Screening—Characterization and Validation of Yeast Related Biofilms in a Brewing Environment with Combined Cultivation and Specific Real-time PCR Screening of Selected Indicator Species. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 77, 99–112. <https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1579036>
- Rodriguez, A., Autio, W.R., McLandsborough, L.A., 2008. Effect of surface roughness and stainless steel finish on *Listeria monocytogenes* attachment and biofilm formation. *J Food Prot* 71, 170–175. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.1.170>
- Romano, A., Perello, M.C., Revel, G. de, Lonvaud-Funel, A., 2008. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *Journal of Applied Microbiology* 104, 1577–1585. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03693.x>
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A., 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int J Food Microbiol* 86, 169–180. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00290-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00290-3)
- Rosini, G., 1984. Assesment of dominance of added yeast in wine fermentation and origine of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 30, 249–256. <https://doi.org/10.2323/jgam.30.249>
- Rozpędowska, E., Hellborg, L., Ishchuk, O.P., Orhan, F., Galafassi, S., Merico, A., Woolfit, M., Compagno, C., Piskur, J., 2011. Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nat Commun* 2, 302. <https://doi.org/10.1038/ncomms1305>
- Rubio, P., Garijo, 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>

- Rupp, S., Summers, E., Lo, H.-J., Madhani, H., Fink, G., 1999. MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene. *EMBO Journal* 18, 1257–1269. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.5.1257>
- Salo, S., Wirtanen, G., 2005. Disinfectant Efficacy on Foodborne Spoilage Yeast Strains. *Food and Bioprocess Technology* 83, 288–296. <https://doi.org/10.1205/fbp.04317>
- Santona, M., Sanna, M.L., Multineddu, C., Fancello, F., de la Fuente, S.A., Dettori, S., Zara, S., 2018. Microbial biodiversity of Sardinian oleic ecosystems. *Food Microbiology* 70, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.004>
- Sanz, S., Olarte, C., Hidalgo-Sanz, R., Ruiz-Ripa, L., Fernández-Fernández, R., García-Vela, S., Martínez-Álvarez, S., Torres, C., 2021. Airborne Dissemination of Bacteria (*Enterococci*, *Staphylococci* and *Enterobacteriaceae*) in a Modern Broiler Farm and Its Environment. *Animals* 11, 1783. <https://doi.org/10.3390/ani11061783>
- 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.184.4.1140-1154.2002>
- Sauer, K., Rickard, Alex.H., Davies, D.G., 2007. Biofilms and Biocomplexity. *Microbe Magazine* 2, 347–353. <https://doi.org/10.1128/microbe.2.347.1>
- Saulou-Bérion, C., 2009. Evaluation des propriétés anti-adhésives et biocides de films nanocomposites avec inclusions d'argent, déposés sur acier inoxydable par procédé plasma.
- Sava, I.G., Heikens, E., Huebner, J., 2010. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect* 16, 533–540. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03213.x>
- Scalise, A., Bianchi, A., Tartaglione, C., Bolletta, E., Pierangeli, M., Torresetti, M., Marazzi, M., Di Benedetto, G., 2015. Microenvironment and microbiology of skin wounds: the role of bacterial biofilms and related factors. *Semin Vasc Surg* 28, 151–159. <https://doi.org/10.1053/j.semvascsurg.2016.01.003>
- Schön, K., Schornsteiner, E., Dzieciol, M., Wagner, M., Müller, M., Schmitz-Esser, S., 2016. Microbial communities in dairy processing environment floor-drains are dominated by product-associated bacteria and yeasts. *Food Control* 70, 210–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.057>

- Schopp, L.M., Lee, J., Osborne, J.P., Chescheir, S.C., Edwards, C.G., 2013. Metabolism of nonesterified and esterified hydroxycinnamic acids in red wines by *Brettanomyces bruxellensis*. *J Agric Food Chem* 61, 11610–11617. <https://doi.org/10.1021/jf403440k>
- Seo, S.-O., Park, S.-K., Jung, S.-C., Ryu, C.-M., Kim, J.-S., 2020. Anti-Contamination Strategies for Yeast Fermentations. *Microorganisms* 8, 274. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020274>
- Serpaggi, V., Remize, F., Le Grand, A., Alexandre, H., 2010. Specific Identification and Quantification of the Spoilage Microorganism *Brettanomyces* in Wine by Flow Cytometry: A Useful Tool for Winemakers. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology* 77, 497–9. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20861>
- 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>
- Serra Colomer, M., Funch, B., Forster, J., 2019. The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. *Current Opinion in Biotechnology, Food Biotechnology • Plant Biotechnology* 56, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.009>
- Sheppard, D.C., Howell, P.L., 2016. Biofilm Exopolysaccharides of Pathogenic Fungi: Lessons from Bacteria *. *Journal of Biological Chemistry* 291, 12529–12537. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.720995>
- Sidari, R., Caridi, A., Howell, K.S., 2014. Wild *Saccharomyces cerevisiae* strains display biofilm-like morphology in contact with polyphenols from grapes and wine. *Int J Food Microbiol* 189, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.012>
- Simeray, J., Mandin, D., Mercier, M., Chaumont, J.-P., 2001. Survey of viable airborne fungal propagules in French wine cellars. *Aerobiologia* 17, 19–24. <https://doi.org/10.1023/A:1007686116283>
- Siverio, J.M., 2002. Assimilation of nitrate by yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 277–284. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00615.x>
- Smit, G., Straver, M.H., Lugtenberg, B.J.J., Kijne, J.W., 1992. Flocculence of *Saccharomyces cerevisiae* cells is induced by nutrient limitation, with cell surface hydrophobicity as a major determinant. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3709–3714. <https://doi.org/10.1128/aem.58.11.3709-3714.1992>

- 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>
- Smith, M.T., 2011. Dekkera van der Walt (1964), in: *The Yeasts*. pp. 373–377. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00025-2>
- Snyder, A.B., Worobo, R.W., 2018. The incidence and impact of microbial spoilage in the production of fruit and vegetable juices as reported by juice manufacturers. *Food Control* 85, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.025>
- Soares, G.A.M., Sato, H.H., 2000. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L killer toxin. *Brazilian Journal of Microbiology* 31, 291–297.
- Song, Q., Kumar, A., 2012. An Overview of Autophagy and Yeast Pseudohyphal Growth: Integration of Signaling Pathways during Nitrogen Stress. *Cells* 1, 263–283. <https://doi.org/10.3390/cells1030263>
- Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S.-D., 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* 31, 572–585. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>
- Stanford, K., Tran, F., Zhang, P., Yang, X., 2021. Biofilm-Forming Capacity of *Escherichia coli* Isolated from Cattle and Beef Packing Plants: Relation to Virulence Attributes, Stage of Processing, Antimicrobial Interventions, and Heat Tolerance. *Appl Environ Microbiol* 87, e0112621. <https://doi.org/10.1128/AEM.01126-21>
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Verstrepen, K.J., 2015. *Brettanomyces* yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 206, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005>
- Stefanini, I., Dapporto, L., Legras, J.-L., Calabretta, A., Di Paola, M., De Filippo, C., Viola, R., Capretti, P., Polsinelli, M., Turillazzi, S., Cavalieri, D., 2012. Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 13398–13403. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208362109>
- 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, 8–15. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-64-0008>
- Suci, P.A., Mittelman, M.W., Yu, F.P., Geesey, G.G., 1994. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38, 2125–2133. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.9.2125>

- Sudbery, P.E., 2001. The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Molecular Microbiology* 41, 19–31. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02459.x>
- Suiker, I.M., Wösten, H.A., 2022. Spoilage yeasts in beer and beer products. *Current Opinion in Food Science* 44, 100815. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100815>
- Sutherland, I.W., 2001. The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9, 222–227. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)02012-1](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)02012-1)
- Suzzi, G., Romano, P., Vannini, L., 1994. Cell surface hydrophobicity and flocculence in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2, 505–510. [https://doi.org/10.1016/0927-7765\(94\)80058-8](https://doi.org/10.1016/0927-7765(94)80058-8)
- T**amaru, Y., Takani, Y., Yoshida, T., Sakamoto, T., 2005. Crucial Role of Extracellular Polysaccharides in Desiccation and Freezing Tolerance in the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*. *Appl Environ Microbiol* 71, 7327–7333. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7327-7333.2005>
- Tazhibaeva, S.M., Musabekov, K.B., Orazymbetova, A.B., Zhubanova, A.A., 2003. Surface Properties of Yeast Cells. *Colloid Journal* 65, 122–124. <https://doi.org/10.1023/A:1022391613491>
- 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>
- Tempère, S., Cuzange, E., Schaaper, M.H., de Lescar, R., de Revel, G., Sicard, G., 2014. “Brett character” in wine: Is there a consensus among professional assessors? A perceptual and conceptual approach. *Food Quality and Preference* 34, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.12.007>
- Tempère, S., Marchal, A., Barbe, J.-C., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Marullo, P., Albertin, W., 2018. The complexity of wine: clarifying the role of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102, 3995–4007. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8914-8>
- Tempère, S., Schaaper, M.H., Cuzange, E., de Lescar, R., de Revel, G., Sicard, G., 2016. The olfactory masking effect of ethylphenols: Characterization and elucidation of its origin.

- Food Quality and Preference 50, 135–144.
<https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.02.004>
- Teoh, A.L., Heard, G., Cox, J., 2004. Yeast ecology of Kombucha fermentation. *Int J Food Microbiol* 95, 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020>
- Tessonnière, H., Vidal, S., Barnavon, L., Alexandre, H., Remize, F., 2009. Design and performance testing of a real-time PCR assay for sensitive and reliable direct quantification of *Brettanomyces* in wine. *Int J Food Microbiol* 129, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.027>
- 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>
- Tomičić, R., Raspor, P., 2017. Influence of growth conditions on adhesion of yeast *Candida spp.* and *Pichia spp.* to stainless steel surfaces. *Food Microbiol* 65, 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.008>
- Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., Fowler, V.G., 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev* 28, 603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- Tran, T., Grandvalet, C., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., Tourdot-Maréchal, R., 2020. Microbial Dynamics between Yeasts and Acetic Acid Bacteria in Kombucha: Impacts on the Chemical Composition of the Beverage. *Foods* 9, 963. <https://doi.org/10.3390/foods9070963>
- Tran, T., Grandvalet, C., Winckler, P., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H., Tourdot-Maréchal, R., 2021. Shedding Light on the Formation and Structure of Kombucha Biofilm Using Two-Photon Fluorescence Microscopy. *Frontiers in Microbiology* 12.
- 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>
- Turvey, M.E., Weiland, F., Meneses, J., Sterenberg, N., Hoffmann, P., 2016. Identification of beer spoilage microorganisms using the MALDI Biotyper platform. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, 2761–2773. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7344-8>

- Urano, H., Nagata, K., Fukuzaki, S., 2002. Adhesion of *Saccharomyces cerevisiae* to alumina surfaces and its removal by caustic alkali cleaning. *Biocontrol Science* 7, 131–137. <https://doi.org/10.4265/bio.7.131>
- Valdez, B., Schorr, M., Lothan, N., Eliezer, A., 2015. Wineries: Equipment, materials, and corrosion. *Materials Performance* 54, 68–71.
- Valle, J., Burgui, S., Langheinrich, D., Gil, C., Solano, C., Toledo-Arana, A., Helbig, R., Lasagni, A., Lasa, I., 2015. Evaluation of Surface Microtopography Engineered by Direct Laser Interference for Bacterial Anti-Biofouling. *Macromolecular Bioscience* 15, 1060–1069. <https://doi.org/10.1002/mabi.201500107>
- Van Der Walt, J.P., 1964. *DEKKERA*, A NEW GENUS OF THE *SACCHAROMYCETACEAE*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 30, 273–280. <https://doi.org/10.1007/BF02046733>
- Van Holle, A., MacHado, M.D., Soares, E.V., 2012. Flocculation in ale brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Re-evaluation of the role of cell surface charge and hydrophobicity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93, 1221–1229. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3502-1>
- Van Mulders, S.E., Christianen, E., Saerens, S.M.G., Daenen, L., Verbelen, P.J., Willaert, R., Verstrepen, K.J., Delvaux, F.R., 2009. Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* 9, 178–190. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00462.x>
- Varela, C., Cuijvers, K., Borneman, A., 2021. Temporal comparison of microbial community structure in an australian winery. *Fermentation* 7. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030134>
- Vasconcellos, A.A.D., Gonçalves, L.M., Del Bel Cury, A.A., Da Silva, W.J., 2014. Environmental pH influences *Candida albicans* biofilms regarding its structure, virulence and susceptibility to fluconazole. *Microbial Pathogenesis* 69–70, 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.03.009>
- Velásquez, C.L., 2023. Chitosan and its applications in oenology. *OENO One* 57, 121–132. <https://doi.org/10.20870/oenone.2023.57.1.7262>

- Vernhet, A., 2019. Chapter 16 - Red Wine Clarification and Stabilization, in: Morata, A. (Ed.), Red Wine Technology. Academic Press, pp. 237–251. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00016-5>
- Verstrepen, K.J., Klis, F.M., 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology* 60, 5–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05072.x>
- Vichi, S., Gallardo-Chacón, J.J., Pradelles, R., Chassagne, D., López-Tamames, E., Buxaderas, S., 2010. Surface properties of *Saccharomyces cerevisiae* lees during sparkling wine ageing and their effect on flocculation. *International Journal of Food Microbiology* 140, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.009>
- Vigentini, I., Romano, A., Compagno, C., Merico, A., Molinari, F., Tirelli, A., Foschino, R., Volonterio, G., 2008. Physiological and oenological traits of different *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strains under wine-model conditions. *FEMS Yeast Research* 8, 1087–1096. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00395.x>
- Villarreal-Soto, S.A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J.-P., Taillandier, P., 2018. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *J Food Sci* 83, 580–588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- Vitzilaiou, E., Stoica, I.M., Knøchel, S., 2019. Microbial biofilm communities on Reverse Osmosis membranes in whey water processing before and after cleaning. *Journal of Membrane Science* 587, 117174. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2019.117174>
- Walker, J.T., Marsh, P.D., 2004. A review of biofilms and their role in microbial contamination of dental unit water systems (DUWS). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 12th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium (Biosorption and Bioremediation III) 54, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.03.012>
- Wang, C., Zhao, J., Qiu, C., Wang, S., Shen, Y., Du, B., Ding, Y., Bao, X., 2017. Coultization of D-Glucose, D-Xylose, and L-Arabinose in *Saccharomyces cerevisiae* by Coexpressing the Metabolic Pathways and Evolutionary Engineering. *BioMed Research International* 2017, e5318232. <https://doi.org/10.1155/2017/5318232>
- Wang, L., Quiceno, R., Price, C., Malpas, R., Woods, J., 2014. Economic and GHG emissions analyses for sugarcane ethanol in Brazil: Looking forward. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 40, 571–582.

- Williams, S., Cleary, I., Thomas, D., 2022. Anaerobic conditions are a major influence on *Candida albicans* chlamyospore formation. *Folia Microbiol (Praha)*. <https://doi.org/10.1007/s12223-022-01018-8>
- Windholtz, S., Dutilh, L., Lucas, M., Maupeu, J., Vallet-Courbin, A., Farris, L., Coulon, J., Masneuf-Pomarède, I., 2021. Population dynamics and yeast diversity in early winemaking stages without sulfites revealed by three complementary approaches. *Applied Sciences (Switzerland)* 11. <https://doi.org/10.3390/app11062494>
- Winkelströter, L., Tulini, F., Martinis, E., 2015. Identification of the bacteriocin produced by cheese isolate *Lactobacillus paraplantarum* FT259 and its potential influence on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *LWT - Food Science and Technology* 64, 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.014>
- X**avier, J.B., Foster, K.R., 2007. Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 876–881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607651104>
- Xu, T., Xiao, Y., Wang, H., Zhu, J., Lee, Y., Zhao, J., Lu, W., Zhang, H., 2022. Characterization of Mixed-Species Biofilms Formed by Four Gut Microbiota. *Microorganisms* 10, 2332. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10122332>
- Y**ang, K., Shi, J., Wang, L., Chen, Y., Liang, C., Yang, L., Wang, L.-N., 2022. Bacterial anti-adhesion surface design: Surface patterning, roughness and wettability: A review. *Journal of Materials Science & Technology* 99, 82–100. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2021.05.028>
- Yuan, L., Hansen, M.F., Røder, H.L., Wang, N., Burmølle, M., He, G., 2020. Mixed-species biofilms in the food industry: Current knowledge and novel control strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60, 2277–2293. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1632790>
- Yuan, Y., P. Hays, M., R. Hardwidge, P., Kim, J., 2017. Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates. *RSC Advances* 7, 14254–14261. <https://doi.org/10.1039/C7RA01571B>

- Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., Fancello, F., Zara, S., 2020. Yeast biofilm in food realms: occurrence and control. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02911-5>
- Zara, S., Bakalinsky, A.T., Zara, G., Pirino, G., Demontis, M.A., Budroni, M., 2005. FLO11-Based Model for Air-Liquid Interfacial Biofilm Formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2934–2939. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.2934-2939.2005>
- Zarnowski, R., Sanchez, H., Andreu, C., Andes, D., del Olmo, M., 2021. Formation and characterization of biofilms formed by salt-tolerant yeast strains in seawater-based growth medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 105, 2411–2426. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11132-1>
- 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, e01333-01314. <https://doi.org/10.1128/mBio.01333-14>
- Zepeda-Mendoza, M.L., Edwards, N.K., Madsen, M.G., Abel-Kistrup, M., Puetz, L., Sicheritz-Ponten, T., Swiegers, J.H., 2018. Influence of *Oenococcus oeni* and *Brettanomyces bruxellensis* on Wine Microbial Taxonomic and Functional Potential Profiles. *Am J Enol Vitic.* 69, 321–333. <https://doi.org/10.5344/ajev.2018.17092>
- Zhang, D., Wang, F., Yu, Y., Ding, S., Chen, T., Sun, W., Liang, C., Yu, B., Ying, H., Liu, D., Chen, Y., 2021. Effect of quorum-sensing molecule 2-phenylethanol and ARO genes on *Saccharomyces cerevisiae* biofilm. *Applied Microbiology and Biotechnology* 105, 3635–3648. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11280-4>
- Zhang, J., Shishatskaya, E.I., Volova, T.G., da Silva, L.F., Chen, G.-Q., 2018. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 86, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.12.035>
- Zimmerli, W., Trampuz, A., Ochsner, P.E., 2004. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 351, 1645–1654. <https://doi.org/10.1056/NEJMra040181>
- Zobell, C.E., Allen, E.C., 1935. The Significance of Marine Bacteria in the Fouling of Submerged Surfaces. *J Bacteriol* 29, 239–251. <https://doi.org/10.1128/jb.29.3.239-251.1935>
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Masneuf-Pomarede, I., 2008. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in

winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 125, 197–203.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.001>

Annexes

Annexe 1 : Liste des 170 souches de *B. bruxellensis* utilisées pour le phénotypage de bioadhésion et de croissance pseudohyphale (chapitre 2)

Groupe génétique	Nombre de souche	Souche
Wine 1 (2n+1)	16	YJS5473 ; YJS5473 ; YJS7872 ; YJS7881 ; YJS7900 ; YJS7902 ; YJS7903 ; YJS7905 ; YJS7972 ; YJ8202 ; YJS8217 ; YJS8218 ; YJS8219 ; YJS8357 ; YJS8743 ; YJS8751 ; YJS8790
Wine 2 (3n)	21	YJS7801 ; YJS7804 ; YJS7807 ; YJS7809 ; YJS7811 ; YJS7823 ; YJS7824 ; YJS7825 ; YJS7833 ; YJS7840 ; YJS7842 ; YJS7887 ; YJS7891 ; YJS7894 ; YJS7959 ; YJS7960 ; YJS8000 ; YJS8045 ; YJS8063 ; YJS8187 ; YJS8457
Wine 3 (2n)	54	YJS5461 ; YJS5463 ; YJS7822 ; YJS7834 ; YJS7844 ; YJS7845 ; YJS7848 ; YJS7849 ; YJS7850 ; YJS7852 ; YJS7863 ; YJS7875 ; YJS7888 ; YJS7911 ; YJS7912 ; YJS7915 ; YJS7920 ; YJS7935 ; YJS7949 ; YJS7976 ; YJS7990 ; YJS8061 ; YJS8062 ; YJS8070 ; YJS8076 ; YJS8079 ; YJS8147 ; YJS8151 ; YJS8261 ; YJS8264 ; YJS8265 ; YJS8277 ; YJS8279 ; YJS8286 ; YJS8289 ; YJS8300 ; YJS8337 ; YJS8351 ; YJS8383 ; YJS8393 ; YJS8429 ; YJS8439 ; YJS8458 ; YJS8528 ; YJS8533 ; YJS8547 ; YJS8591 ; YJS8614 ; YJS8642 ; YJS8666 ; YJS8670 ; YJS8705 ; YJS8718 ; YJS8815
Beer (2n+1)	39	YJS5396 ; YJS7816 ; YJS7861 ; YJS7864 ; YJS7865 ; YJS7866 ; YJS7867 ; YJS7868 ; YJS7873 ; YJS7895 ; YJS7907 ; YJS7919 ; YJS7926 ; YJS7928 ; YJS7933 ; YJS7937 ; YJS7939 ; YJS7940 ; YJS7946 ; YJS7966 ; YJS7985 ; YJS8037 ; YJS8069 ; YJS8077 ; YJS8162 ; YJS8177 ; YJS8228 ; YJS8239 ; YJS8340 ; YJS8255 ; YJS8500 ; YJS8501 ; YJS8502 ; YJS8600 ; YJS8664 ; YJS8690 ; YJS8700 ; YJS8826 ; YJS8827
Kombucha (2n)	26	YJS5301 ; YJS5310 ; YJS5334 ; YJS5349 ; YJS5384 ; YJS5398 ; YJS5402 ; YJS5407 ; YJS5417 ; YJS7879 ; YJS7909 ; YJS7910 ; YJS7921 ; YJS7923 ; YJS8019 ; YJS8024 ; YJS8046 ; YJS8074 ; YJS8123 ; YJS8243 ; YJS8247 ; YJS8285 ; YJS8304 ; YJS8615 ; YJS8625 ; YJS8640
Teq/EtOH	13	YJS7819 ; YJS7820 ; YJS7828 ; YJS7829 ; YJS7839 ; YJS7860 ; YJS7890 ; YJS7954 ; YJS8003 ; YJS8004 ; YJS8014 ; YJS8028 ; YJS8068

Annexe 2 : Validation of *B. bruxellensis* isolates identification by MALDI-TOF MS analysis

Winery	Appellation	Identification	Area	Code	Socre MALDI-TOF
CH-1	Lustrac- Médoc	Air	Air Wooden cellar	CH-1.1	2.56
				CH-1.2	2.87
				CH-1.3	2.32
		Wooden tun	C1C Inside	CH-1.4	2.95
			C1C Bottom	CH-1.5	2.76
			C1C Inside	CH-1.6	2.41
			C1C Bottom	CH-1.7	2.44
			C2C Bottom	CH-1.8	2.65
			C2C Bottom	CH-1.9	2.68
			C3C Inside	CH-1.10	2.77
			C3C Inside	CH-1.11	2.61
			C3C Bottom	CH-1.12	2.83
			C3C Bottom	CH-1.13	2.88
			C5C Inside	CH-1.14	2.33
			C22C Inside	CH-1.15	2.64
			C22C Bottom	CH-1.16	2.54
			C25C Inside	CH-1.17	2.59
			C26C Bottom	CH-1.18	2.63
			C26C Bottom	CH-1.19	2.91
			C26C Bottom	CH-1.20	2.31
CH-3	Pessac Léognan	Concrete vats	C44H Inside	CH-3.1	2.87
			C44H Bottom	CH-3.2	2.90
			C44H RD	CH-3.3	2.91
			C27H RD	CH-3.4	2.67
			C11H Tartric acid	CH-3.5	2.84
			C11H Tartric acid	CH-3.6	2.37
			C11H Tartric acid	CH-3.7	2.56
			C11H Tartric acid	CH-3.8	2.71

Résumé : Recherches sur les propriétés de bioadhésion de l'espèce *Brettanomyces bruxellensis* ; applications à l'hygiène des caves et à la prévention de la contamination des vins

Brettanomyces bruxellensis est une levure rencontrée dans de nombreuses boissons fermentées (vins, bière, cidre, téquila, kombucha). En œnologie, cette espèce est considérée comme une levure d'altération, produisant des phénols volatils qui évoquent des odeurs de sueur de cheval, d'écurie et masquent la perception des arômes fruités des vins rouges. Dans cet environnement hostile, *Brettanomyces bruxellensis* serait capable de survivre grâce à des aptitudes particulières d'adhésion et de colonisation des surfaces abiotiques pour former des édifices tridimensionnels encore appelés « biofilms ». Les principaux objectifs de cette thèse sont (i) de caractériser les propriétés physico-chimiques de surface et de bioadhésion d'un ensemble de souche représentatif de la diversité de l'espèce, (ii) d'étudier l'impact de facteurs biotiques et abiotiques sur la bioadhésion sur un sous ensemble d'individu présentant des comportements contrastés, (iii) d'évaluer la capacité à la formation de biofilm et les conséquences sur la contamination des vins (iv) d'explorer les zones à risques au chai et formuler des recommandations en terme de prévention de la contamination.

La caractérisation des propriétés physico-chimiques de surface et de bioadhésion a mis en évidence un caractère hydrophile et une charge de surface négative avec des différences selon le groupe génétique. Concernant la capacité de bioadhésion, toutes les souches testées ont montré des aptitudes à bioadhérer sur l'inox avec cependant des différences selon le groupe génétique. Le pH et la concentration en éthanol n'ont pas d'impact significatif sur la bioadhésion, la variance étant principalement expliquée par le facteur souche, montrant que ce phénotype serait déterminé au niveau génétique. Nos travaux confirment que *Brettanomyces* possède la capacité à croître et bioadhérer sous forme de pseudohyphes, en particulier pour certains isolats du groupe Kombucha, bioéthanol. La capacité à former un biofilm est souche dépendante et variable selon les modèles pluri-souches ou pluri-espèces, la présence d'un biofilm bactérien limitant la bioadhésion par *Brettanomyces*. Enfin, les analyses de surface au chai ont confirmé la présence de *Brettanomyces* sur certains équipements de la cuverie, avec la présence de différents groupes génétiques au sein d'un même prélèvement.

Mots clés : *Brettanomyces bruxellensis* – Levure – Bioadhésion – Biofilm – Vin – Contamination

Abstract: Research on bioadhesion properties of the species *Brettanomyces bruxellensis*; applications for cellar hygiene and the prevention of wine contamination

Brettanomyces bruxellensis is a yeast associated many fermented beverages (wine, beer, cider, tequila, kombucha). In oenology, this species is considered a spoilage yeast, producing volatile phenols that remind smells of horse sweat, stable and mask the perception of fruity aromas of red wines. In this hostile environment, *Brettanomyces bruxellensis* would be able to survive thanks to special abilities of adhesion and colonization of abiotic surfaces to form three-dimensional edifices also called "biofilms". The main objectives of this thesis are (i) to characterize the surface physico-chemical and bioadhesion properties of some strains representatives of the species diversity, (ii) to study the impact of biotic and abiotic factors on the bioadhesion of a subset of individuals with contrasting behaviors, (iii) to evaluate the capacity for biofilm formation and the consequences on wine contamination (iv) to explore risk areas in the cellar and make recommendations in terms of contamination prevention. Regarding the bioadhesion capacity, all the strains tested showed abilities to bioadhere to stainless steel with differences according to the genetic group. The pH and ethanol concentration do not have a significant impact on bioadhesion, the variance being mainly explained by the strain factor, showing that this phenotype would be determined at the genetic level. Our work confirms that *Brettanomyces* can grow and bioadhere as pseudohyphae, especially for some isolates of the Kombucha and Bioethanol groups. The ability to form a biofilm is strain-dependent and according to mixed-strains or mixed-species models, the presence of a bacterial biofilm limiting bioadhesion by *Brettanomyces*. Finally, surface analyses in the cellar confirmed the presence of *Brettanomyces* on certain equipment in the winery, with the presence of different genetic groups within the same sample.

Keywords: *Brettanomyces bruxellensis* – Yeast – Bioadhesion – Biofilm – Wine – Spoilage

Unité Mixte de Recherche Oenologie UMR 1366
Univ. Bordeaux, INRAE, Bordeaux INP, Bordeaux Sciences Agro, Oeno
Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, 33140 Villenave d'Ornon, France