

XV workshop sobre Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria (MRAMA)

Dra. M^a del Carmen Portillo Guisado (Universitat Rovira i Virgili, Tarragona) – carmen.portillo@urv.cat

"Alteraciones microbiológicas en vinos y cavas: quiénes las producen y cómo detectarlos"

Quiénes producen las alteraciones microbiológicas de vinos y cavas

La transformación de mosto de uva en vino es un proceso ecológico y bioquímico complejo que implica el desarrollo secuencial de especies microbianas tales como levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas (Pretorius, 2000). Cualquiera de estos microorganismos es susceptible de producir bien efectos positivos en el vino o cava o bien alteraciones no deseables dependiendo de la etapa en la que nos encontremos y en qué cantidad se encuentren.

El número de levaduras en la uva, justo antes de la cosecha varía de 10^3 a 10^6 células/ml (Romano et al., 2006) en función de las variedades de uvas, las condiciones climáticas, prácticas vitícolas, etapa de maduración, el daño físico (causada por hongos, insectos y aves) y fungicidas aplicados a los viñedos (Pretorius et al., 1999). Aunque, el mosto de uva es relativamente completo en cuanto a nutrientes, el bajo pH y el alto contenido en azúcar determinan que solo unas pocas bacterias y especies de levaduras puedan crecer. Además, la adición de dióxido de azufre, principal compuesto antioxidante y antimicrobiano, impone una selección adicional, principalmente contra bacterias y levaduras con menor poder fermentativo. Otro factor importante es la restricción creada por las condiciones anaeróbicas una vez iniciada la fermentación. Al inicio de la fermentación, las especies de levaduras predominantes pertenecen a las levaduras denominadas no-*Saccharomyces* de los géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Starmerella*, *Dekkera* y *Schizosaccharomyces*. Por el contrario, la población de la principal levadura vínica *Saccharomyces cerevisiae* en el mosto es muy baja. Las levaduras no-*Saccharomyces* proliferan en los primeros días de fermentación hasta poblaciones aproximadamente de 10^6 - 10^7 células/ml. Sin embargo, durante la fermentación alcohólica el aumento de la concentración de etanol, el agotamiento de nutrientes claves como el nitrógeno y el aumento constante de la temperatura de fermentación favorecen la rápida proliferación de las cepas de *S. cerevisiae* llegando a alcanzar poblaciones entre 5×10^7 - 10^8 ufc/ml en detrimento de estas otras especies mayoritarias en el mosto de uva (Goddard, 2008; Salvadó et al, 2011). En ocasiones, algunas levaduras como *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* y *Zygosaccharomyces* aparecen en fases finales de la fermentación alcohólica. Sin embargo, esta presencia suele ir asociada a fermentaciones problemáticas y que acaban en alteraciones de la calidad del vino final.

Así pues, durante la fermentación alcohólica (FA), las levaduras son las verdaderas protagonistas (levaduras no-*Saccharomyces* al principio y *Saccharomyces* posteriormente) mientras que la contribución de bacterias lácticas y acéticas a la fermentación alcohólica es considerada nula y su desarrollo suele estar ligado a alteraciones. Sin embargo, a pesar de que no haya proliferación, sí que hay supervivencia de bacterias (recuentos de 10^2 a 10^4 ufc/ml en el mosto) y, después de la fermentación alcohólica, hay un crecimiento de las poblaciones de bacterias lácticas supervivientes (hasta 10^7 ufc/ml) que llevarán a cabo la fermentación maloláctica (FML) que consiste en la transformación del ácido málico presente de forma natural en el vino en ácido láctico y CO_2 . Tan pronto como el ácido málico se transforma completamente a ácido láctico, esta población de bacterias comienza a declinar. No obstante, si el vino no está suficientemente sulfitado después de la FML, estas bacterias permanecen durante meses. Durante la FML las alteraciones que pueden producirse en el vino dependen fundamentalmente de la existencia de sustratos capaces de ser metabolizados en ese momento por las bacterias lácticas, por levaduras residuales que hayan sobrevivido a la FA o por las

bacterias acéticas. Un vino en el que se han consumido todos los azúcares durante la FA presenta una probabilidad de sufrir alteraciones muchísimo más baja que aquellos en los que se ha producido una parada de fermentación o en los que ha quedado una cierta cantidad de azúcares residuales que no han podido ser consumidos por las levaduras. Las bacterias acéticas también pueden estar presentes durante la fermentación tanto alcohólica como maloláctica. Su presencia depende mayoritariamente de la calidad sanitaria de la uva de origen. Uvas podridas, por exceso de lluvias, o contaminadas con *Botrytis cinerea* producen mostos con poblaciones muy elevadas de acéticas. En el mosto, las especies mayoritarias son *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti* y *A. pasteurianus*, y, en menor medida, *Gluconacetobacter liquefaciens* y *Ga. hansenii* (González et al., 2005), que son las aisladas mayoritariamente también en la uva. Durante la fermentación alcohólica, como consecuencia de las fuertes condiciones de anaerobiosis impuestas por el metabolismo de las levaduras, y la alta dependencia del oxígeno que presentan las acéticas para su desarrollo, las posibilidades de proliferación son prácticamente nulas. Sin embargo, estas bacterias son mucho más resistentes al sulfuroso, bajo pH, etanol, etc., que las bacterias lácticas. De manera que al final de la fermentación alcohólica presentan poblaciones todavía elevadas, que pueden proliferar si las condiciones de almacenamiento o crianza del vino no son las adecuadas, fundamentalmente sulfitado correcto y almacenamiento en atmósferas anaerobias. Si proliferan las bacterias acéticas, el vino final se altera con presencia de ácidos acético producido por el metabolismo de las mismas.

Por último, *Brettanomyces bruxellensis* ha sido caracterizada históricamente como la principal levadura contaminante responsable de la formación de fenoles volátiles como el 4-etilfenol, 4-etilguaicol y tetrahidropiridinas, que producen aromas desagradables y que alteran el vino, sobre todo en las etapas de la crianza del vino y embotellado donde las poblaciones de esta levadura aumentan de manera lenta pero sin competencia, originando los principales riesgos.

En el caso del cava, parte de los problemas descritos anteriormente no serían aplicables porque el mosto original sufre filtraciones que bajan la carga microbiológica inicial disminuyendo el riesgo de contaminación. Sin embargo, también se tiende a añadir poca cantidad o ninguna de sulfito, lo que puede dar problemas de aparición de bacterias lácticas y refermentaciones en botellas.

Cómo detectar los microorganismos que alteran vinos y cavas

El sector vinícola necesita técnicas rápidas y prácticas para la monitorización y detección de microorganismos que causan el deterioro del vino o el cava en cualquiera de sus etapas de fabricación y almacenado para evitar las consecuentes pérdidas económicas. Tanto levaduras como bacterias pueden ser responsables de la contaminación vino o cava y su fuente primordial de contaminación suele ser el propio ambiente de la bodega.

A pesar de que en muchas ocasiones se ha podido establecer una relación directa entre especies alterantes y alteraciones específicas del vino, ésta no ha sido siempre la situación real, dándose deterioro del vino con poblaciones muy bajas de especies deteriorantes conocidas hasta el momento (e incluso en casos en los que no se detectan). Asimismo, no se conocen con precisión las razones por las que una determinada población alterante se desarrolla en un momento determinado en una tina de fermentación, bodega o botella de cava mientras que en otras del mismo origen y con las mismas condiciones no manifiesta dicha población. Entre las razones plausibles se podría considerar que las comunidades microbianas en cada tina, bodega o botella han evolucionado de forma diferente y la interacción con otros microorganismos podría favorecer el desarrollo de las poblaciones alterantes. Este hecho dificulta la predicción de la posible contaminación y su control.

Tradicionalmente, la detección de los microorganismos que alteran el vino se ha realizado mediante técnicas dependientes de cultivo o análisis sensoriales. Sin embargo, algunos microorganismos no son capaces de crecer en los medios empleados o tienen un crecimiento lento, lo cual alarga la detección.

Por otro lado, al igual que los métodos sensoriales, los métodos basados en el cultivo de microorganismos suelen ser confirmativos, dificultando una acción de previsión. Recientemente, la utilización de técnicas moleculares basadas en el material genético supone una ventaja respecto a las técnicas clásicas basadas en el cultivo, pues no es necesario el cultivo para la detección y son más sensibles a la hora de detectar cierto microorganismo. No obstante, el material y conocimiento necesario para llevar a cabo las técnicas moleculares no está siempre al alcance de una bodega pequeña o mediana.

Las técnicas más usuales a nivel de bodega en la actualidad son la observación al microscopio, cultivo en placas de medio selectivo o general, análisis sensoriales, cromatografía de gases, análisis de PCR y luminómetros. Estos últimos son equipos de bioluminiscencia basados en la detección del ATP (adenosine triphosphate), que es la molécula energética por excelencia y se encuentra en todos los organismos vivos, con lo que su cuantificación sería proporcional a la presencia de organismos con actividad metabólica. El análisis mediante luminómetros de las muestras tomadas de las superficies de las bodegas mediante hisopos o bastoncillos estériles sería una buena indicación de presencia o ausencia de microflora, siendo un método rápido para monitorizar la eficiencia en la limpieza de equipos y superficies, aunque los microorganismos específicos quedarían sin identificar.

Las técnicas moleculares utilizadas para la detección y estudio de microorganismos en el vino incluyen análisis como la restricción del ADN mitocondrial (Martorell et al., 2006), PCR-RFLP (Dias et al., 2003; Esteve-Zarzoso et al., 1999), PCR-RAPD (Martorell et al., 2006), PCR con cebadores específicos (Campolongo et al., 2010) y PCR anidada (Ibeas et al., 1996). Sin embargo, muchas de estas técnicas necesitan un paso de enriquecimiento previo para extraer el ADN de forma que son técnicas semi-cuantitativas. Por ello, se está tendiendo al uso de qPCR (PCR cuantitativa) para la detección específica y cuantificación directa de microorganismos contaminantes del vino como *B. bruxellensis*. Aunque estas técnicas reducen el tiempo de análisis con respecto a las técnicas de cultivo y detectan incluso las células VPNC, al usar el ADN se detectan tanto células vivas como muertas, pudiendo dar lugar a una sobreestimación del número de levaduras en la muestra (Andorrà et al., 2010). Gracias a la introducción del bromuro monoazódico de etidio (EMA) o bromuro moazódico de propidio (PMB) combinados con la qPCR se han podido detectar únicamente las células vivas (Andorrà et al., 2010). Sin embargo, es necesario optimizar la concentración de EMA para ensayos diferentes y la concentración de etanol afecta los resultados (Andorrà et al., 2010). El ARN es considerado como un buen indicador de viabilidad ya que se degrada más rápidamente que el ADN (Ivey y Phister, 2011) aunque también es dependiente del gen usado para la detección. El problema principal de la qPCR a partir tanto de ADN como de ARN es que la qPCR sólo detecta y cuantifica los microorganismos diana para los cuales hayamos diseñado cebadores de amplificación específicos y, en la actualidad, se desconoce si dichos microorganismos son los únicos implicados en el deterioro del vino.

Una nueva técnica molecular que puede emplearse para el estudio de la diversidad microbiana es la secuenciación masiva o HTS (de sus siglas en inglés high throughput sequencing). Consiste en la secuenciación de miles de secuencias por cada muestra tras la extracción directa de ácidos nucleicos de la matriz que se esté estudiando, en nuestro caso el vino o cava. Existen diferentes tecnologías de secuenciación masiva (Shendure and Ji, 2008) cada una con sus ventajas y desventajas (Suzuki et al., 2011; Liu et al., 2012). El estudio de la composición microbiana se realiza de forma habitual mediante la amplificación de genes de interés taxonómico (normalmente el gen ARNr 16S para bacterias y el gen de ARNr 18S o el ITS para hongos) y puede ofrecer la proporción de los distintos grupos taxonómicos dentro de un alimento mediante la secuenciación de estos genes y su comparación con las bases de datos de referencia que proporcionarán la identificación de las distintas secuencias con lo que, además, tiene carácter cuantitativo.

En los últimos años la secuenciación masiva se ha aplicado en prácticamente todos los campos de investigación de microbiología incluidos estudios sobre alimentos aunque el coste de estos análisis y el

requerimiento de habilidades específicas bioinformáticas aún limitan su aplicación industrial. Muchos de estos estudios tenían un marcado carácter de ecología microbiana (revisado en Ercolini, 2013) y, recientemente, se ha puesto de manifiesto la capacidad y potencial de estas técnicas de HTS para poder detectar contaminaciones en alimentos y su posible trazabilidad en el entorno en el cual se procesan dichos alimentos (De Filippis et al., 2013). Hay que recordar que en muchos alimentos existen microorganismos pertenecientes al mismo género y en estos casos los estudios de HTS basados en secuencias muy cortas a nivel de género no serían de utilidad para diferenciar entre dichas especies. En estos casos, para obtener información a nivel de especie habría que tener como diana fragmentos más largos incluyendo más regiones variables de los genes taxonómicos o bien, complementar la técnica de HTS con alguna técnica de tipificación de especies como la RFLP (por ejemplo, Bokulich et al., 2012). La ventaja indudable que las técnicas HTS aportarían al estudio de la contaminación microbiana del vino o cava es que, al obtener miles de secuencias para una única muestra, se puede tener una descripción detallada de los microorganismos presentes en el deterioro y el cambio poblacional previo a la proliferación de un determinado microorganismo responsable de la alteración, con lo que podría tener carácter predictivo. Además, las técnicas HTS pueden procesar cientos de muestras simultáneamente y se pueden realizar tanto a partir de ADN como de ARN, con lo que se podría tener información tanto de los microorganismos presentes, como los metabólicamente activos en el momento del deterioro, respectivamente. Por otro lado, mediante la metatranscriptómica (secuenciación masiva de todos los genes que se están transcribiendo en un determinado momento) se podría tener información de las interacciones metabólicas entre los distintos microorganismos implicados en el deterioro del vino. Todas estas técnicas basadas en secuenciación masiva, sin duda ofrecen una oportunidad para un estudio más detallado de los microbios responsables de la fermentación del vino y en su caso, de su posible deterioro.

Aunque las técnicas HTS no sean aplicables a corto plazo por las bodegas como rutina debido a los elevados costes de inversión en la tecnología necesaria y el grado de conocimiento específico que se necesita para realizar dicho análisis e interpretación de datos, sí que se pueden desarrollar servicios a bodegas para que realicen análisis periódicos de poblaciones en vinos de crianza y así poder prevenir posibles contaminaciones microbianas.

Bibliografía

- 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.
- Bokulich, N.A., Joseph, C.M.L., Allen, G., Benson, A.K., Mills, D.A. 2012. Next-generation sequencing reveals significant bacterial diversity of botrytized wine. *PLoS ONE*, 7: e36357. doi:10.1371/journal.pone.0036357.
- Campolongo, S., Rantsiou, K., Giordano, M., Gerbi, V., Cocolin, L. 2010. Prevalence and biodiversity of *Brettanomyces bruxellensis* in wine from Northwestern Italy. *Am J Enol Vitic*, 61(4): 486-491.
- De Filippis, F., La Stora, A., Villani, F., Ercolini, D. 2013. Exploring the sources of beefsteaks contamination by culture-independent high-throughput sequencing. *PLoS ONE*, 8: e70222.
- Dias, L. Pereira-da-Silva, S., Tavares, M., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. 2003. Factors affecting the production of 4ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiol*, 4: 377-384.
- Ercolini, D. 2013. High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Appl Environ Microbiol*, 79(10): 3148-3155.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers, *Int J Syst Bacteriol*, 49: 329-337.
- Goddard, M.R. 2008. Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. *Ecology*, 89: 2077-2082.

- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M. 2005.** Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *Int J Food Microbiol*, 102: 295-304.
- Ibeas, J.I., Lozano, I., Perdignes, F., Jimenez, J. 1996.** Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl Environ Microbiol*, 62(3): 998-1003.
- Ivey, M.L., Phister, T. 2011.** Detection and identification of microorganisms in wine: a review of molecular techniques. *J Ind Microbiol Biotech*, 38: 1619-1634.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M. 2012.** Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*, 2012: 251364.
- 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.
- Millet, V., Lonvaud-Funel, A. 2000.** The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage. *Lett Appl Microbiol*, 30: 136-141.
- Pretorius, I.S., 2000.** Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16: 675-729.
- 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. *S Afr J Enol Vitic*, 20: 61-70.
- Romano, P., Capece, A., Jespersen, L. 2006.** Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts. In: *Yeast in Food Beverages*. Querol A & Fleet GH (eds). pp. 55-82. Springer, Berlin, Germany.
- Salvadó, Z., Arroyo-López, F.N., Barrio, E., Querol, A., Guillamón, J.M. 2011.** Quantifying the individual effects of ethanol and temperature on the fitness advantage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol*, 28: 1155-1161.
- Shendure, J., Ji, H. 2008.** Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*, 26: 1135-1145.
- Suzuki, S., Ono, N., Furusawa, C., Ying, B.-W., Yomo, T. 2011.** Comparison of sequence reads obtained from three next-generation sequencing platforms. *PLoS ONE*, 6: e19534. doi:10.1371/journal.pone.0019534.