

IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL VINO MEDIANTE HIBRIDACIÓN EN EL “ENCHIP”

Rosario Mañes Lázaro, Sergi Ferrer, Isabel Pardo

ENOLAB-Laboratorio de Microbiología Enológica, Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Valencia, C/ Doctor Moliner 50, 46100 Burjassot (Valencia). 96 354 3145 Rosario.Manyes@uv.es

Resumen:

El objetivo de este trabajo ha sido la identificación de los microorganismos presentes durante la vinificación utilizando un enochip. El enochip se basa en el uso de sondas de DNA específicas para detectar las diferentes especies de bacterias y levaduras que se han descrito como implicadas en el proceso de vinificación. Las sondas específicas se han diseñado a partir de regiones variables de los genes 16S para bacterias y 26S para levaduras.

Una de las principales ventajas que confiere este sistema de identificación frente a otros alternativos es que permite detectar microorganismos directamente desde el vino, sin necesidad de realizar cultivos. Otra cualidad del sistema es que permite detectar todos los microorganismos presentes en la muestra al mismo tiempo, tanto si son levaduras como bacterias lácticas o acéticas.

Se han analizado diferentes mostos y vinos de la D.O. Utiel-Requena con esta técnica. Los resultados obtenidos se han contrastado con los proporcionados por otras técnicas moleculares (16S ARDRA), lográndose unos resultados similares en todos los casos.

Las principales ventajas del uso de este sistema son su rapidez, su versatilidad y su fiabilidad.

Palabras clave: enochip, bacterias acéticas, bacterias lácticas, levaduras, vino

1. INTRODUCCIÓN

Gran cantidad de microorganismos se desarrollan a lo largo del proceso de vinificación. Las levaduras suelen estar presentes en el mosto y en el vino en las primeras fases de su elaboración, especialmente la especie *Saccharomyces cerevisiae*, responsable de la fermentación alcohólica. También podemos encontrar otras levaduras alterantes que dan lugar a sabores o aromas no deseables. Las bacterias lácticas (BL) se desarrollan una vez las levaduras han completado la primera fermentación. Son las responsables de la fermentación maloláctica, proceso muy deseable para la obtención de vinos de calidad, aunque también pueden causar alteraciones. Las bacterias acéticas (BA) siempre tienen efectos perjudiciales produciendo el picado acético de los vinos.

El objetivo de este trabajo es evaluar el uso de un chip electrónico para monitorizar la evolución de las especies de microorganismos durante la vinificación. Para ello hemos utilizado un enochip basado en el uso de sondas de DNA específicas para las diferentes especies de bacterias y levaduras asociadas al proceso de vinificación. Las sondas específicas de especie se han diseñado en base a regiones variables de los genes 16S y 26S para bacterias y levaduras respectivamente. Se ha contrastado la fiabilidad de la identificación por este método utilizando otras técnicas moleculares de identificación previamente descritas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Origen y procesamiento de las muestras de vino

Se tomaron muestras en diferentes momentos de la vinificación de uvas Macabeo, Bobal y Tempranillo de la

D.O. Utiel-Requena: mosto, vino al final de la fermentación alcohólica y en fermentación maloláctica. Las muestras se sembraron en diferentes medios de cultivo sólidos: MRS con 0.5 g/L de L-cisteína y MLO (ambos con natamicina), y GPYA, y se incubaron cuatro días a 28 °C hasta obtener colonias aisladas. Las colonias crecidas se identificaron mediante la técnica del 16S-ARDRA e ITS-ARDRA, descritas a continuación. En paralelo se realizó una extracción del ADN total y una posterior amplificación para identificar las especies presentes mediante el enochip.

2.2. Identificación de especies mediante el enochip

A partir de 1 mL de cada muestra se realizó la extracción de ADN según el protocolo descrito por Gindreau et al. [1] incubando 10 minutos la muestra al añadir la PVP (polivinilpirrolidona).

Se amplificó por PCR un fragmento del gen ribosomal 16S de alrededor de 360 pb utilizando los cebadores I1B biotinilado e I2B [2] para detectar las BL. También se amplificó otro fragmento del mismo gen de aproximadamente 260 pb con los cebadores I7B biotinilado e I8B para detectar las BA. Y por último se amplificó un fragmento del gen 26S con los cebadores NL1 biotinilado y NL4 [3] para detectar las levaduras. Tras purificar los amplificados mediante un kit de purificación y cuantificar el DNA, las muestras se diluyeron a una concentración de 500 nM en agua Mili Q y desnaturalizaron en un termociclador a 94 °C durante 5 minutos. Las muestras biotiniladas se colocaron en una placa multipocillos y fueron dirigidas electrónicamente a posiciones concretas del chip con un volumen de histidina 100 mM y se añadió un control que contenía histidina 100 mM y agua Mili Q en el mismo volumen final que las muestras. La hibridación se llevó



a cabo según las instrucciones de NanoChip Molecular Biology Workstation, tal como describe [4]. Las sondas específicas utilizadas estaban marcadas con los fluoróforos Cy3 y Cy5 y la señal de fluorescencia fue leída a diferentes temperaturas progresivamente mayores, 24, 25, 27 y 29 °C para los dos fluoróforos empleados.

2.3. Identificación de especies mediante 16S-ARDRA / ITS-ARDRA

En el caso de las bacterias, se amplificó por PCR el gen 16S, según describe Rodas *et al.* [5]. Se amplificó también el fragmento ITS de las levaduras con los cebadores ITS1 y ITS4 [6]. Se llevó a cabo la digestión de 500 ng del producto amplificado con 5 U de enzimas de restricción: *MseI* para las bacterias lácticas, *AluI* para las acéticas y *HaeIII* para las levaduras, incubando 3 horas a 37 °C. Posteriormente los fragmentos de restricción se separaron en un gel de agarosa al 2% obteniéndose un perfil de bandas característico para cada especie.

Los perfiles de restricción obtenidos a partir de los diferentes aislados fueron introducidos junto a los de diferentes cepas de referencia en el programa Bionumerics version 2.5 (Applied Maths) y analizados usando el método de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de correlación de Dice.

3. RESULTADOS

3.1. Identificación de especies mediante el enochip

Los resultados obtenidos con el enochip se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Especies de bacterias y levaduras identificadas con el enochip. A: *Acetobacter*; G: *Gluconobacter*; Ga: *Gluconacetobacter*; L: *Lactobacillus*; O: *Oenococcus*; P: *Pichia*; S: *Saccharomyces*; N.D.: no detectado.

Uva	Mosto	FFA	FML
Macabeo	A. <i>pasteurianus</i> , G. <i>oxydans</i> , S. <i>cerevisiae</i>	G. <i>oxydans</i> , Ga. <i>liquefaciens</i> , S. <i>cerevisiae</i>	N.D.
Bobal	A. <i>aceti</i> , G. <i>oxydans</i> , Ga. <i>liquefaciens</i> , L. <i>plantarum</i> , S. <i>cerevisiae</i>	G. <i>oxydans</i> , Ga. <i>liquefaciens</i> , L. <i>plantarum</i> , O. <i>oeni</i> , S. <i>cerevisiae</i>	G. <i>oxydans</i> , Ga. <i>liquefaciens</i> , L. <i>plantarum</i> , O. <i>oeni</i> , S. <i>cerevisiae</i>
Tempranillo	G. <i>oxydans</i> , P. <i>membranaefaciens</i> , S. <i>cerevisiae</i>	S. <i>cerevisiae</i>	N.D.

3.2. Identificación de especies mediante 16S-ARDRA / ITS-ARDRA

Los resultados obtenidos por la técnica del ARDRA se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Especies de bacterias y levaduras identificadas por 16S-ARDRA / ITS-ARDRA. H: *Hanseniaspora*; P: *Pediococcus*; T: *Torulasporea*; N.D.: no detectado.

Uva	Mosto	FFA	FML
Macabeo	A. <i>aceti</i> , A. <i>pasteurianus</i> , G. <i>oxydans</i> , Ga. <i>hansenii</i> , L. <i>mali</i> , O. <i>Oeni</i> , S. <i>cerevisiae</i>	O. <i>oeni</i> , S. <i>cerevisiae</i>	N.D.
Bobal	A. <i>aceti</i> , G. <i>oxydans</i> , H. <i>Uvarum</i> , L. <i>mali</i> , O. <i>oeni</i> , P. <i>pentosaceus</i> , S. <i>cerevisiae</i>	O. <i>oeni</i> , S. <i>cerevisiae</i>	O. <i>oeni</i> , S. <i>cerevisiae</i>
Tempranillo	G. <i>oxydans</i> , L. <i>mali</i> , L. <i>plantarum</i> /pentosus, O. <i>oeni</i> , P. <i>membranaefaciens</i> , S. <i>cerevisiae</i> , T. <i>delbruecki</i>	O. <i>oeni</i> , S. <i>cerevisiae</i>	N.D.

4. CONCLUSIONES

El enochip permite la identificación directa de los microorganismos desde el vino, pese a ser un medio complejo y con gran cantidad de inhibidores. Ésta es una de las principales ventajas de esta técnica ya que podemos detectar microorganismos sin necesidad de realizar cultivos, lo cual reduce bastante los tiempos de los análisis y facilita la adopción de medidas correctoras rápidas. Además, algunos de los aislados sólo fueron detectados por esta técnica, ya que no crecieron en placa debido posiblemente, a su reducida viabilidad o a su difícil adaptación a crecer en medios de laboratorio. Un ejemplo de ello fue la identificación de la bacteria acética *Gluconacetobacter liquefaciens* que se encontraba presente en la mayoría de los vinos analizados y en uno de los mostos, y que a pesar de ello no se pudo aislar en placa.

En general, la técnica del ARDRA permitió identificar un mayor número de especies que el enochip. Es el caso de las levaduras *Torulasporea delbruecki* y *Hanseniaspora uvarum*; la razón que explica este hecho parece estar relacionada con la baja concentración relativa de estas especies en las muestras. Posiblemente, la gran cantidad de ADN total dificulta la correcta hibridación de las especies minoritarias con su sonda específica.

Por lo tanto, la identificación de los microorganismos del vino con el enochip supone una interesante alternativa a las ya conocidas, siempre y cuando no se encuentren en una proporción relativa muy baja. Las principales ventajas del enochip frente a otras técnicas moleculares de identificación que requieren del cultivo, es su rapidez y su capacidad de detectar varios microorganismos al mismo tiempo. Estas ventajas suponen que se puedan adoptar tempranamente medidas de seguridad que eviten alteraciones antes de que la elevada concentración de microorganismos comprometa la calidad final del vino.

5. BIBLIOGRAFÍA

- GINDREAU, E.; WALLING, E.; LONVAUD-FUNEL, A. 2001. Direct polymerase chain reaction detection of rosy *Pediococcus damnosus* strains in wine. *Journal of Applied Microbiology* 90: 535-42
- RODAS, AM.; FERRER, S.; PARDO, I. 2005. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 197-207
- MILLS, D. A.; JOHANSEN, E. A., COCOLIN, L. 2002. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4884-93
- MAÑES, R.; PARDO, I.; FERRER, S. 2005. Diseño de sondas de hibridación para un biochip capaz de detectar microorganismos alterantes de vinos. *Avances en ciencias y técnicas enológicas-1. Jornadas Científicas de los Grupos de Investigación Enológica. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León. GIENOL 2005.* ISBN: 84-933654-8-3 pp 205-206



5. RODAS, AM.; FERRER, S.; PARDO, I. 2003. **16S-ARDRA, a tool for Identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine.** *Systematic and Applied Microbiology* 26: 412-22
6. 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 riboso-**

mal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 329-37

6. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado con el proyecto AGL2003-03689.