



# DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *Brettanomyces/Dekkera* EN VINOS POR TÉCNICAS MOLECULARES

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:

Se ha descrito una gran variedad de levaduras como contaminantes del vino. De todas ellas, las especies de *Brettanomyces/Dekkera* son probablemente las que más preocupan al sector enológico. Se ha demostrado que estas levaduras son capaces de desarrollarse en vinos de crianza o en botella, a pesar de los elevados niveles de etanol, y de producir olores desagradables por síntesis de compuestos fenólicos olores atribuidos a esta levadura varían desde olor animal, establo, sudor de caballo, cuero...

El objetivo de nuestro trabajo fue la detección e identificación de *Brettanomyces/Dekkera* en diferentes vinos tintos cuyas propiedades organolépticas estaban alteradas. La detección directa del vino se llevó a cabo mediante el empleo de un enochip con sondas específicas para esta especie. Paralelamente, se sembraron placas de cultivo de las que se recuperaron colonias para su identificación mediante ITS-ARDRA y PCR específica. Los resultados obtenidos fueron similares con todas las técnicas empleadas, lo que demuestra la validez del enochip para detectar e identificar *Brettanomyces/Dekkera* directamente del vino, sin necesidad de cultivo previo.

**Palabras clave:** *Brettanomyces/Dekkera*, enochip, PCR específica, ITS-ARDRA, detección e identificación

## 1. INTRODUCCIÓN

Una gran variedad de levaduras se han descrito como contaminantes del vino. Las levaduras del género *Brettanomyces*, que se conocían desde hace tiempo como contaminantes de cerveza y sidra, también se han descrito como contaminantes de vinos. Concretamente, la especie *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* se ha detectado en vinos tintos que llevan más de seis meses en bodega y es en este período de crianza donde la población de estas levaduras aumenta de manera lenta pero sin competencia.

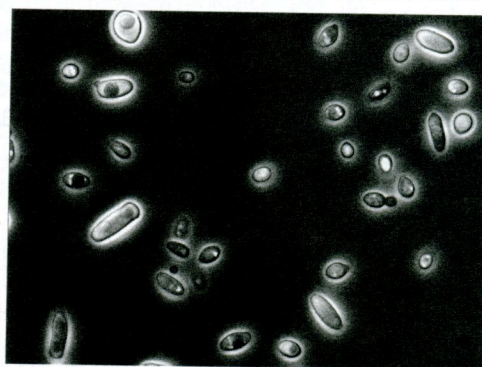
El principal efecto perjudicial que estas levaduras tienen sobre el vino es el desarrollo de aromas desagradables que se describen como olor a animal, establo, sudor de caballo, cuero u orina de ratón entre otros. Esto es debido a la capacidad de estos microorganismos para sintetizar compuestos fenólicos volátiles mediante descarboxilación de los ácidos hidroxicinámicos, obteniéndose como resultado final los etilfenoles. De ahí la gran necesidad de desarrollar para su detección métodos moleculares rápidos que no requieran el cultivo, ya que los que sí dependen de cultivo retrasan la identificación una o dos semanas.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de vinos de la D.O. Rioja que estaban en proceso de envejecimiento en bodega y que mostraban alteradas sus propiedades aromáticas. Las muestras fueron sometidas a métodos moleculares de detección e identificación de *Brettanomyces* spp. dependientes (ITS-ARDRA) e independientes de cultivo (enochip). Para los métodos dependientes de cultivo, las muestras se sembraron en medio de cultivo sólido GPYA y se incubaron siete días a 28 °C hasta obtener colonias aisladas. Éstas se observaron al

microscopio y se seleccionaron las que tenían la morfología celular ojival o cilíndrica propia de *Brettanomyces* [1], tal como se muestra en la Fig.1.

Fig. 1. Levaduras aisladas del vino observadas al microscopio



### 2.1. Identificación de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* en el enochip

A partir de 1 mL de cada muestra se realizó la extracción de ADN según el protocolo descrito por Gindreau *et al.* [2] incubando 10 minutos la muestra al añadir la PVP.

Se amplificó un fragmento del gen 26S con los cebadores NL1 biotinilado y NL4 [3] y los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa y purificados mediante un kit de purificación. Tras cuantificar el DNA en un gel de agarosa con un marcador de concentración (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen), las muestras fueron diluidas a 500 nM y desnaturalizadas en un termociclador. Se colocaron en una placa multipocillos con un volumen de histidina 100 mM y fueron dirigidas electrónicamente a posiciones concretas del chip. La hibridación con la sonda específica de *D. bruxellensis* se

llevó a cabo según las instrucciones de NanoChip Molecular Biology Workstation [4]. La sonda estaba marcada con el fluoróforo Cy3 y la señal de fluorescencia se detectó a diferentes temperaturas progresivamente mayores, 24, 25, 27 y 29 °C.

### 2.3. Identificación de *B./D. bruxellensis* por la técnica ITS-ARDRA

Se amplificó por PCR el fragmento ITS de las levaduras con los cebadores ITS1 y ITS4 [5] directamente desde colonia. Tras visualizar los productos de PCR en un gel de agarosa, se cuantificaron y se llevó a cabo la digestión de 500 ng de ADN con 5 U de *Hae*III, incubándose 3 horas a 37 °C. Posteriormente los fragmentos de restricción se observaron en un gel de agarosa al 2%.

Los perfiles de restricción obtenidos de los diferentes aislados fueron comparados con los de varias cepas de referencia, entre las que se encontraba *D. bruxellensis* CECT 1451<sup>T</sup>.

### 2.4. Detección de *Brettanomyces* por PCR específica

A partir de las colonias crecidas en las placas se realizó una PCR con los cebadores DB90F y DB394R descritos por Cocolin *et al.* [6] que amplifican específicamente un fragmento de aproximadamente 305 pb del ADN de *B. bruxellensis* y *B. anomalus*. Se incluyeron otras levaduras del vino como control negativo. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa.

## 3. RESULTADOS

En una de las muestras analizadas con el enochip, se detectó hibridación con la sonda específica de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis*, tal como se muestra en la Fig.2. La señal de fluorescencia fue al menos tres veces más intensa que el ruido de fondo.

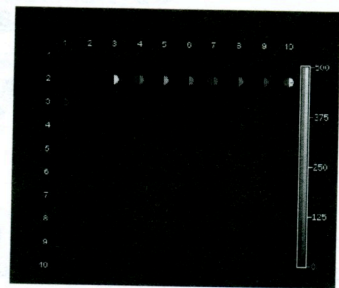
Se observó crecimiento en las placas de todos los vinos analizados pero sólo en la muestra correspondiente al mismo vino en el que se detectó señal de hibridación con el enochip, apareció un tipo de colonia cuya morfología colonial y celular se correspondía con la de *Brettanomyces*. El recuento en placa de esta muestra reveló que el tamaño de la población era 30 UFC/mL. Todos los aislados seleccionados como posibles *Brettanomyces* mostraron el mismo patrón de restricción que la cepa de referencia de *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* CECT 1451<sup>T</sup> cuando se analizaron por la técnica del ARDRA.

Los mismos aislados se amplificaron con los cebadores específicos DB90F y DB394R y todos dieron un producto de PCR del tamaño esperado (305 pb). Ninguna levadura perteneciente a otras especies, empleadas como controles negativos, dieron lugar a un fragmento de amplificación.

## 4. CONCLUSIONES

De todas las muestras analizadas, sólo una mostró la presencia de *Brettanomyces/Dekkera*. Los resultados de identificación fueron idénticos por las tres técnicas empleadas, tanto dependientes como independientes de cultivo. En las placas

Fig. 2. Intensidad de fluorescencia de la hibridación de las muestras con la sonda específica de *Brettanomyces* en el enochip. Las posiciones 3 y 10 de la segunda fila, corresponden a la muestra que dio señal positiva.



correspondientes a las otras muestras, crecieron colonias bacterianas pero no se observó ninguna levadura. Hay que tener en cuenta el bajo nivel de detección de la técnica del enochip, ya que fue capaz de detectar la presencia de tan solo 30 ufc/mL.

Aunque los resultados fueron idénticos con todas las técnicas empleadas, los obtenidos por técnicas independientes de cultivo son mucho más rápidos, unas pocas horas, frente a los métodos tradicionales con siembra en placa que conllevan de 1 a 2 semanas. Ello contribuirá a una rápida actuación, incluso preventiva, que evitará alteraciones del vino.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. NAVASCUÉS, E. 2007. *Brettanomyces/Dekkera: control y detección en bodegas*. ACE Revista de Enología-CIENCIA 78: 14-20
2. 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
3. MILLS, D. A.; JOHANNSEN, E. A.; COCOLIN, L. 2002. *Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 4884-93
4. 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. ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. 1999. *Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers*. International Journal of Systematic Bacteriology 49: 329-37
6. COCOLIN, L.; RANTSIOU, K.; IACUMIN, L.; ZIRONI R.; COMI, G. 2004. *Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalus* in spoiled wines*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 1347-55

## 6. AGRADECIMIENTOS

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