UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Diversidad de levaduras no-*Saccharomyces* en diferentes ecosistemas vitivinícolas
Autor/es
María Elena Ocón Sáenz
Director/es
Ana Rosa Gutiérrez Viguera y Susana Sanz Cervera
Facultad
Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico
2014-2015

Tesis presentada como compendio de publicaciones. La edición en abierto de la misma NO incluye las partes afectadas por cesión de derechos

Diversidad de levaduras no-*Saccharomyces* en diferentes ecosistemas vitivinícolas, tesis doctoral
de María Elena Ocón Sáenz, dirigida por Ana Rosa Gutiérrez Viguera y Susana Sanz Cervera (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor
© Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2015
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es

Diversidad de levaduras no-*Saccharomyces* en diferentes ecosistemas vitivinícolas

María Elena Ocón Sáenz

Tesis Doctoral

Logroño, 2014

UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Diversidad de levaduras no-*Saccharomyces* en diferentes ecosistemas vitivinícolas

MEMORIA PRESENTADA POR

María Elena Ocón Sáenz

para optar al grado de Doctora por la Universidad de La Rioja

Logroño, septiembre de 2014

Este trabajo ha sido posible gracias a la Beca F.P.I. en Microbiología Enológica concedida por la Consejería de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente, y desarrollada en el Servicio de Investigación y Desarrollo Agroalimentario de La Rioja (2002-2005) y a los siguientes proyectos de investigación, todos ellos financiados por el Gobierno de La Rioja:
R-03-03: Ecología de la fermentación alcohólica en ecosistemas naturales e inoculados de la D.O.Ca. Rioja.
R-04-03: Puesta a punto de técnicas de Biología Molecular para el control microbiológico de levaduras y bacterias durante la fermentación alcohólica y maloláctica.
R-06-04: Identificación y caracterización molecular de microorganismos de interés enológico.
R-07-04: Diversidad genética en levaduras de vinificación de la D.O.Ca.Rioja. Mantenimiento de un banco de levaduras autóctonas.
FOMENTA 2007/04: Análisis de la calidad microbiológica del aire de las bodegas. Estudio del aire como vía de diseminación de microorganismos útiles y de alteración.

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría mostrar mi agradecimiento al Servicio de Investigación y Desarrollo Agroalimentario de La Rioja y al Departamento de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja por haber podido realizar mi trabajo en sus centros. También a las bodegas que nos cedieron sus instalaciones para realizar nuestros muestreos: Bodega Cooperativa de Alcanadre, Bodegas Viña Ijalba, Bodega Torre de Oña, Bodegas Bilbaínas, Bodegas Olarra, Bodegas Valdemar y Bodegas Baigorri.

De mi primera etapa como becaria en el CIDA quiero mencionar a varias personas.

A mis "jefas", Pili y Rosa, por su cercanía y porque confiaron en mí y me formaron como investigadora en el CIDA. A Rosa, además, por aceptar codirigir esta tesis.

A mis maestras y compañeras, Patri y Carmen, que me introdujeron en el mundo de la "micro" y compartieron conmigo sus conocimientos.

Y al resto de compañeras y compañeros de ese Centro, por los buenos ratos compartidos y todo lo aprendido.

En la "uni", a Carmen, por su participación y ayuda en este trabajo y por enseñarme, junto con Susana, tanto de mohos. Y a las otras dos codirectoras de esta tesis, Susana, por su alegría y sus palabras de ánimo, y Ana Rosa, por su dedicación y empuje. Sin vosotras, sin vuestra colaboración y consejos este trabajo no habría visto la luz.

Además, me gustaría agradecer la presencia cercana de algunas personas que, aun sin darse cuenta, me han ayudado muchísimo a realizar este trabajo.

A Kone, por tu paciencia y tu apoyo en esta última etapa.

A mi familia, porque siempre habéis creído en mí. En especial, a mi madre, Elena, y a mis hermanas, Sara y Laura. A las tres, gracias por vuestro amor, infinita confianza y respeto.

A mi madre.

A Emma y Elías, mis pequeños.

Índice

Presentación del trabajo 1

1. Introducción 5

1.1. La elaboración del vino 7

1.2. Levaduras que participan en la vinificación: *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* 8

1.3. Origen de las levaduras que participan en la vinificación 9

1.3.1. Levaduras en las uvas 9

1.3.2. Levaduras en la bodega 11

1.4. Dinámica de las poblaciones de levaduras en la vinificación 12

1.5. Contribución de las levaduras no-*Saccharomyces* a la calidad de los vinos 16

1.6. Utilización de inóculos mixtos *Saccharomyces*/no-*Saccharomyces* 18

1.7. Levaduras alterantes de la calidad de los vinos 22

1.8. Diseminación de las levaduras enológicas en la bodega 25

Referencias bibliográficas 28

2. Objetivos 39

3. Metodología 43

3.1. Presentación de los ensayos 45

3.2. Plan de trabajo 46

3.2.1. Ensayos en uvas. Estudio de las levaduras no-*Saccharomyces* presentes en uvas de la D.O.Ca. Rioja 46

3.2.2. Ensayos en fermentación alcohólica. Estudio de las levaduras presentes en fermentaciones alcohólicas espontáneas en la D.O.Ca. Rioja 47

3.2.3. Ensayo en superficies y en mosto en contacto con las mismas. Estudio de las levaduras presentes en el equipamiento de la bodega y en el mosto durante la vendimia 47

3.2.4. Ensayos en aire. Estudio de las levaduras presentes en el aire de una bodega a lo largo de un año 48

3.3. Descripción de la metodología 49

3.3.1. Toma y procesamiento de las muestras 49

3.3.1.1. Muestreos de uvas 49

3.3.1.2. Muestreos durante las fermentaciones alcohólicas 50

3.3.1.3. Muestreos de instalaciones 51

3.3.1.4. Muestreos de mostos 51

3.3.1.5. Muestreos de aire 51
3.3.2. Recuentos y selección de colonias 53
3.3.2.1. Recuento y selección en uva 53
3.3.2.2. Recuento y selección en fermentaciones alcohólicas 53
3.3.2.3. Recuento y selección en superficies 54
3.3.2.4. Recuento y selección en mosto 54
3.3.2.5. Recuento y selección en aire 54
3.3.3. Aislamiento y conservación de colonias 55
3.3.4. Identificación de las colonias aisladas 55
3.3.4.1. Extracción del ADN 55
3.3.4.2. Identificación de las especies de levaduras mediante PCR-RFLP 55
3.3.4.3. Identificación de las especies de levaduras mediante la secuenciación del ADN 60
3.3.4.4. Identificación de la especie *Brettanomyces bruxellensis* mediante PCR anidada 61
3.3.5. Medios de cultivo y disoluciones 64
3.3.5.1. Medios de cultivo para aislamiento y crecimiento de levaduras 64
3.3.5.2. Disoluciones base 66
Referencias bibliográficas 68
4. Resultados 69
4.1. Estudio de las levaduras no-*Saccharomyces* presentes en uvas en la D.O.Ca.Rioja 71
4.2. Análisis cuantitativo y cualitativo de levaduras no-*Saccharomyces* en fermentaciones alcohólicas espontáneas 83
4.3. Presencia de levaduras no-*Saccharomyces* en el equipamiento de la bodega y en el mosto en la época de vendimia 97
4.4. Análisis de las levaduras presentes en el aire de una bodega a lo largo de un año 109
4.5. Estudio de las levaduras del aire de las bodegas y el riesgo de contaminación del vino 121
4.6. Comparación de medios de cultivo para la recuperación de levaduras presentes en el aire en bodegas 135
5. Discusión general 149
6. Conclusiones 173

Presentación del trabajo

Esta memoria de Tesis Doctoral se presenta en forma de compendio de publicaciones científicas, siguiendo la normativa de la Universidad de La Rioja aprobada por Consejo de Gobierno el 22 de Julio de 2005.

Este trabajo ha sido realizado a lo largo de varios años y podría decirse que en dos etapas bien diferenciadas. En el año 2002, me fue concedida una beca del Gobierno de La Rioja de Formación de Personal Investigador en Microbiología Enológica, gracias a la cual formé parte del equipo de trabajo de Microbiología de la Sección de Enología y Viticultura del Servicio de Investigación y Desarrollo Agrario de la Consejería de Agricultura de La Rioja (CIDA).

En aquel momento participé en varios proyectos que tenían por objeto el estudio de las especies de levaduras no-*Saccharomyces* presentes en las fermentaciones alcohólicas de la Denominación de Origen Calificada Rioja. Para ello, en primer lugar se pusieron a punto algunas técnicas de biología molecular para la identificación de microorganismos enológicos y posteriormente se estudió, con ayuda de esas técnicas, los géneros, especies y cepas de microorganismos que aparecían con mayor frecuencia en las fermentaciones de la región. El objetivo final era utilizar ese conocimiento para una futura selección de levaduras no-*Saccharomyces* de interés para vinificaciones controladas, como ya había realizado dicho equipo de trabajo con anterioridad con levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. En la actualidad, todos los microorganismos aislados en estos trabajos se están estudiando para tal fin.

En aquellos primeros años se consideró interesante estudiar qué levaduras estaban presentes en la materia prima de las vinificaciones de la región y su relación con las especies detectadas a lo largo de las fermentaciones alcohólicas. Los resultados obtenidos se presentaron como memoria para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados.

Dado que otra fuente importante de levaduras en las fermentaciones son las instalaciones de las bodegas colonizadas por ellas en años anteriores, se continuó el trabajo en esa línea, intentando ampliar el conocimiento de las especies presentes en el equipamiento de las bodegas y estudiando también su relación con las detectadas en los mostos encubados.

Hasta ese momento se habían abordado los posibles orígenes de las distintas especies y su presencia en el medio fermentativo, suponiendo que el mecanismo de transmisión de las levaduras era el simple contacto entre los distintos medios: uvas, mostos y equipamiento de la bodega.

Pero existe otro vehículo de transmisión de microorganismos que no había sido apenas estudiado en la industria enológica, aunque sí en otros tipos de industrias alimentarias: el aire.

La necesidad de conocer este medio de transmisión de microorganismos en el ecosistema enológico llevó a un grupo de investigación en la Universidad de La Rioja, junto con parte del grupo de investigación con el que realicé mis anteriores trabajos, a trabajar en el Proyecto FOMENTA 2007/04, con el que se comenzó a estudiar la diversidad de levaduras presentes en el aire de las bodegas de la D.O.Ca. Rioja, su relación con las actividades llevadas a cabo en las bodegas y la posibilidad de establecer el control del aire como un mecanismo de detección de ciertas contaminaciones en los vinos.

Los resultados de estos estudios, en los que trabajé como parte del equipo en la Universidad de La Rioja, dieron forma final a este conjunto que hoy se presenta en forma de memoria de tesis doctoral, y que pretende ser una aproximación al conocimiento de las levaduras, principalmente del grupo no-*Saccharomyces*, presentes en los ecosistemas vitivinícolas de la región de la D.O.Ca. Rioja.

Los trabajos presentados son seis:

1. Estudio de las levaduras no-*Saccharomyces* presentes en uvas.

2. Análisis cuantitativo y cualitativo de levaduras no-*Saccharomyces* en fermentaciones alcohólicas espontáneas.

3. Presencia de levaduras no-*Saccharomyces* en el equipamiento de la bodega y en el mosto durante la época de vendimia.

4. Análisis de las levaduras presentes en el aire de una bodega a lo largo de un año.

5. Estudio de las levaduras del aire de las bodegas y su riesgo de contaminación del vino.

6. Comparación de medios de cultivo para la recuperación de levaduras presentes en el aire de las bodegas.

La estructura de esta memoria incluye los siguientes apartados, además de esta *Presentación del trabajo*. En primer lugar, una *Introducción*, que recoge algunos de los aspectos más importantes estudiados acerca del tema que nos ocupa. A continuación, los *Objetivos*, que focalizan el propósito de este estudio. El apartado de la *Metodología* describe en detalle el esquema de trabajo y los métodos y técnicas seguidas para obtener los resultados, que se recogen en forma de artículos publicados en revistas científicas y sus resúmenes, a excepción del primero, en el apartado *Resultados*. Para finalizar, el apartado *Discusión General* permite obtener una visión general del conjunto del trabajo estableciendo relaciones entre los distintos ecosistemas estudiados, lo que lleva a completar el apartado final de *Conclusiones*.

1. Introducción

1.1. La elaboración del vino

El vino es un producto natural resultado de numerosas reacciones bioquímicas, que tienen lugar desde la maduración de las bayas, pasando por la vendimia, la fermentación alcohólica, la fermentación maloláctica, la estabilización, la crianza, la clarificación, etc., hasta después del embotellado. Muchas de esas reacciones se deben a los microorganismos presentes tanto en las uvas como en las superficies de la bodega, entre los que se encuentra una gran variedad de levaduras.

En la elaboración del vino las transformaciones bioquímicas más importantes conducidas por microorganismos son la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica. La fermentación alcohólica ocurre en primer lugar y es el proceso bioquímico por el cual los azúcares del mosto se transforman fundamentalmente en etanol y anhídrido carbónico, debido a la acción de algunas levaduras. La fermentación maloláctica consiste básicamente en la desacidificación biológica del vino mediante la transformación del ácido L(-) málico (dicarboxílico) en ácido L(+) láctico (monocarboxílico) y anhídrido carbónico, por acción de algunas bacterias lácticas, principalmente de la especie *Oenococcus oeni*. Generalmente, la fermentación maloláctica tiene lugar después de la fermentación alcohólica, ocasionando una disminución de la acidez total y un incremento del pH y modificando así las características organolépticas del vino. Estas dos reacciones bioquímicas llevadas a cabo por microorganismos contribuyen esencialmente a la calidad final del producto (Swiegers et al., 2005).

La fermentación alcohólica es la única imprescindible en la elaboración de los vinos, puesto que mediante esa reacción tiene lugar la transformación de los azúcares procedentes de la uva en etanol y, por tanto, el paso de mosto a vino. Las levaduras transforman parcialmente la glucosa y la fructosa (azúcares fermentables por ellas en condiciones enológicas) en alcohol etílico, anhídrido carbónico y cientos de otros metabolitos secundarios que afectarán a la calidad final del vino y a sus características organolépticas (Flanzy, 2000; Blouin y Peynaud, 2004). Durante el proceso se puede encontrar una gran diversidad de especies de levaduras (Fleet et al., 1984; Fleet, 1993; Querol et al., 1994), de las que sólo una pequeña proporción

participa de forma notable (Romano et al., 2003a). Las levaduras predominan durante la fermentación alcohólica, dada su mejor adaptación al bajo pH y a la alta concentración de azúcares del mosto y, normalmente, cuando los azúcares reductores son transformados en etanol, la población de levaduras disminuye y el desarrollo de las bacterias lácticas comienza a ser importante.

La vinificación incluye, además de las fermentaciones anteriores, procesos de conservación y envejecimiento, así como tratamientos de estabilización y embotellado. Durante estas etapas también pueden desarrollarse microorganismos que afectan a la calidad final del vino, entre los que se encuentran diferentes géneros y especies de levaduras.

1.2. Levaduras que participan en la vinificación: *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*

La vinificación es básicamente el resultado de la acción secuenciada de varias especies de levaduras pertenecientes a géneros distintos. La principal levadura que lleva a cabo la fermentación alcohólica es *Saccharomyces cerevisiae*, pero no es la única que interviene en el proceso, sobre todo si la fermentación se realiza de forma espontánea. Existe una gran diversidad de especies, conocidas en general como levaduras no-*Saccharomyces*, que intervienen en mayor o menor medida en la fermentación alcohólica, sobre todo, en sus primeras fases (Jolly et al., 2003a).

Aunque se conocen algo más de 100 géneros distintos, las levaduras enológicas que están presentes de manera significativa en la uva, en el mosto, que intervienen en el proceso fermentativo, o son capaces de desarrollar alteraciones en el vino, están representadas por algo más de una quincena de géneros, entre ellos *Hanseniaspora/Kloeckera, Candida, Pichia*, *Hansenula*, *Torulaspora, Rhodotorula, Metschnikowia*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Cryptococcus, Saccharomyces, Schizosaccharomyce*s y *Zygosaccharomyces* (Kurtzman y Fell, 1998; Ribéreau-Gayon et al., 1998; Hidalgo, 2002). En cualquier caso, y, salvo excepciones, en los mostos en fermentación las cepas predominantes pertenecen a la especie *S. cerevisiae*, levadura de gran pureza fermentativa y típicamente alcohógena.

La inoculación del mosto por todos estos microorganismos se produce de forma espontánea con las levaduras que se encuentran en el hollejo de la uva y con las presentes en el equipamiento y maquinaria de la bodega (Pretorius et al., 1999).

1.3. Origen de las levaduras que participan en la vinificación

1.3.1. Levaduras en las uvas

La superficie de las uvas tiene una ecología microbiana muy compleja, con gran diversidad de bacterias, hongos filamentosos y levaduras, que influirán en las características de los mostos y, por tanto, en las propiedades del vino resultante.

Tradicionalmente se ha considerado a las uvas como la primera fuente de microorganismos que participan en la vinificación, pudiendo ser detectados en las bayas desde el inicio de la maduración (Lafon-Lafourcade, 1983). Pero estos microorganismos necesitan un vector que les permita llegar hasta ellas. Algunos investigadores opinan que son llevados hasta los racimos debido al efecto del viento (Carrascosa et al., 2005) y por insectos como abejas, avispas y *Drosophila* (Parle y di Mena, 1966; Mortimer y Polsinelli, 1999; Zacchi y Vaughan-Martini, 2002) y recientemente se ha comprobado la diseminación de levaduras de interés enológico también por medio de pájaros migratorios (Francesca et al., 2012).

Las poblaciones de levaduras encontradas en las uvas suelen ser del orden de 10^3 a 10^5 células/grano, dependiendo del grado de madurez de la baya, del estado sanitario, de las condiciones climáticas del cultivo (lluvias, temperatura) y de los tratamientos sanitarios aplicados (Hidalgo, 2003; Fleet, 2008).

Así mismo, la diversidad de las poblaciones de las levaduras que habitan la superficie de las uvas viene determinada por estos y otros factores. El suelo, la variedad de uva y las técnicas culturales empleadas en el viñedo pueden influir en el ecosistema microbiano de las uvas (Renouf et al., 2005 y 2006). Además, la distribución de especies varía entre zonas geográficas y entre vendimias sucesivas, aunque casi siempre se encuentran los mismos géneros (Jolly et al., 2003a).

Sin embargo, en la actualidad se considera que el principal factor que afecta cuantitativa y cualitativamente a la ecología microbiana de las uvas es la integridad de los granos, condicionada principalmente por el estado sanitario de las uvas y el grado de maduración de las mismas (Barata et al., 2012). Así, en las bayas sanas e intactas se detectan las mismas especies de levaduras que en las hojas de la vid, que son basidiomicetos de los géneros *Cryptococcus, Rhodotorula* o *Sporobolomyces,* y la especie *Aureobasidium pullulans*. A medida que la epidermis de la uva va debilitándose con la maduración se observa un aumento importante en el número de especies de ascomicetos oxidativos o con metabolismo débilmente fermentativo, como los géneros *Candida, Hanseniaspora*, *Metschnikowia* o *Pichia*. Cuando los granos tienen su cutícula dañada la disponibilidad de azúcares es mayor para los microorganismos, lo que permite el desarrollo de especies con mayor capacidad fermentativa, como *Zygoascus hellenicus* y otras del género *Pichia*, así como especies con capacidad para alterar los mostos y los vinos, como *Zygosaccharomyces bailli*. Además, en estos granos también es más probable también la detección de *S. cerevisiae*.

En los estudios llevados a cabo por numerosos investigadores, en los que el muestreo de las uvas no estableció diferencias entre uvas sanas y uvas con su cutícula dañada (lo que es similar a una vendimia real), las levaduras apiculadas del género *Kloeckera* (especialmente *K. apiculata*) y *Hanseniaspora* (*H. uvarum*) pueden llegar a constituir desde el 50 al 99% de las levaduras aisladas en las bayas. También se pueden encontrar, aunque en menor proporción, especies de *Candida*, *Cryptococcus, Rhodotorula, Pichia, Kluyveromyces, Hansenula, Brettanomyces,* etc. La especie *S. cerevisiae* rara vez es aislada en uvas (Fleet y Heard, 1993; van der Westhuizen et al., 2000 a y b; Ribéreau-Gayon et al., 2003; Vaughan-Martini y Martini, 1995) utilizando las técnicas habituales de muestreo para levaduras. Ello es debido a la baja población de *S. cerevisiae* en la superficie de las bayas, que en ocasiones está presente en porcentajes inferiores al 0,1% del total de levaduras, por lo que no suele detectarse ni en todas las vides ni en todos los granos de uva (Török et al., 1996; van der Westhuizen et al., 2000; Mercado et al., 2007). Sin embargo, al disminuir el grado de integridad de la uva y aumentar la disponibilidad de azúcares, es detectada en mayor proporción. Así, Schuller et al. (2005) identificaron esta especie en las uvas de un viñedo de la región de Vinho Verde en cantidad suficiente como para llevar a cabo la fermentación alcohólica.

En algunos estudios recientes, entre ellos, el llevado a cabo por Guzzon et al. (2014), se ha comprobado la importancia que tiene la micobiota de la superficie de las bayas en la

obtención de una uva de calidad. Este grupo ha observado que algunos géneros de levaduras presentes en la uva protegen a la misma de la proliferación del hongo *Botrytis cinerea,* causante de podredumbre en los granos. Así, levaduras de los géneros *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* e *Issatchenkia* podrían actuar como agentes de biocontrol frente a ese hongo.

1.3.2. Levaduras en la bodega

Las levaduras que permanecen en el equipamiento y las instalaciones de las bodegas pueden pasar al mosto o al vino mediante el contacto con la maquinaria del procesado de la vendimia, o con los equipos utilizados durante la fermentación o el almacenamiento del vino terminado.

Así, en la bodega se pueden detectar levaduras que se encuentran fijadas sobre suelos, paredes, depósitos, conducciones y maquinaria de procesado, como tolvas, prensas, bombas, etc. Estos microorganismos procederían del contacto de estos equipos y superficies con las uvas y los mostos en fermentación de vendimias anteriores, siendo su micobiota diferente, en principio, a la de las uvas. Algunos autores apuntan a que estas poblaciones están formadas mayoritariamente por *S. cerevisiae* (Fleet y Heard, 1993; Constantí et al., 1997; Pretorius, 1999; Pretorius, 2000, Martini, 2003). Sin embargo, otros estudios han demostrado también la presencia de levaduras no-*Saccharomyces* en las superficies de la bodega, como especies de los géneros *Pichia, Hansenula, Brettanomyces* o *Candida* (Martini 1993; Vaughan-Martini y Martini, 1995). En este sentido, Sabaté et al. (2002) comprobaron que el 76.7% de las colonias aisladas de la pared interior de los depósitos de fermentación de una bodega dos días antes de la entrada de la vendimia correspondía a la especie *Candida sorbosa* (forma anamorfa de *Issatchenkia occidentalis*), que fue aislada junto a otras especies, como *Rhodotorula* sp y *Candida zeylanoides*, y que únicamente el 10% de los aislados pertenecían a la especie *S. cerevisiae*. Más recientemente, Santamaría et al. (2008), mostraron de nuevo que el grupo no-*Saccharomyces* constituye, en ocasiones, la mayoría de las colonias en ciertas zonas de las bodegas. De igual forma, Garijo (2010) comprobó que el 63% de las colonias aisladas de las instalaciones de una bodega de la D.O.Ca. Rioja fuera de la época de la vinificación pertenecían al grupo no-*Saccharomyces*.

Las especies que se pueden encontrar en las superficies de las instalaciones de las bodegas y en su maquinaria serán, entre otras, las que hayan estado presentes en las uvas y en las fermentaciones alcohólicas realizadas anteriormente en esas bodegas, y que sean capaces de permanecer en ambientes aerobios o en restos de vino o mosto y que no se hayan eliminado completamente de las instalaciones. Así, Renouf et al. (2007a) comprobaron la presencia en la superficie de barricas y depósitos de géneros de levaduras que anteriormente habían detectado en las uvas, como *Cryptococcus* y *Burkholderia*, lo que confirmaba el paso de estos microorganismos desde las uvas a las instalaciones de la bodega. A pesar de que esas levaduras no se desarrollaron en el mosto o en el vino, fueron capaces de sobrevivir en dichos medios y establecerse en el ecosistema de la bodega. En el caso de *S. cerevisiae*, estudiada en mayor profundidad en el equipamiento de la bodega, se ha comprobado la presencia de clones en esas superficies que habían participado en la fermentación del año anterior en la misma instalación (Sabaté et al., 2002). Por ello, el grado de limpieza y la naturaleza de las superficies de las instalaciones de las bodegas son fundamentales a la hora de determinar el tamaño y la diversidad de estas poblaciones residentes en el ecosistema de la bodega. Así, superficies irregulares o materiales no pulidos albergarían un mayor número de levaduras (Pretorius, 2000). Esta maquinaria y equipos, al entrar en contacto con nuevas vendimias, permitirían el paso de las levaduras a los mostos, lo que supone otra fuente de aporte de levaduras además de las que aporta la propia uva (Guillamón, 1996; Jolly et al., 2003b).

A diferencia de lo que ocurre con las uvas, no existe mucha bibliografía acerca de las poblaciones de las levaduras no-*Saccharomyces* en las instalaciones de las bodegas, por lo que será interesante profundizar en su conocimiento, una vez que se ha comprobado que no están formadas únicamente ni de forma mayoritaria por la especie *S. cerevisiae*.

1.4. Dinámica de las poblaciones de levaduras en la vinificación

A partir del momento en que las uvas entran en la bodega se puede apreciar una evolución en la presencia de las distintas especies de levaduras. Durante las primeras horas de elaboración tras el encubado de la vendimia, se produce en el mosto una multiplicación de los mismos géneros de levadura que contienen las uvas. Según algunos autores, las principales

levaduras no-*Saccharomyces* que se desarrollan al inicio de las fermentaciones espontáneas son apiculadas e incluyen las especies *Kloeckera apiculata*/*Hanseniaspora uvarum*, *Kloeckera apis*/*Hanseniaspora guilliermondii*, *Kloeckera africana*/*Hanseniaspora vineae*, *Kloeckera corticis*/*Hanseniaspora osmophila* y *Kloeckera javanica*/*Hanseniaspora occidentalis* (Jolly et al., 2006). Pero también, en las primeras fases de las fermentaciones espontáneas, aparece el género *Candida* de forma predominante, sobre todo, la especie *C. stellata*, y otros géneros como *Metschnikowia, Pichia, Zygoascus, Issatchenkia, Torulaspora* (Albertin et al., 2014) y, ocasionalmente, *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Rhodotorula* y *Zygosaccharomyce*s (Clemente-Jiménez et al., 2004).

Hay que tener en cuenta que no todas las levaduras presentes en las uvas son capaces de aclimatarse a las condiciones del mosto, que son muy diferentes a las de la superficie de las uvas (bajo pH, poca disponibilidad de oxígeno, alta presión osmótica y presencia de anhídrido sulfuroso), por lo que algunos géneros identificados en las uvas no son fácilmente detectados en la fermentación. Aún así, en el mosto suele detectarse una mayor diversidad que en las uvas, lo que podría explicarse por el aporte de levaduras presentes en el material de la bodega al entrar éste en contacto con la vendimia (Jolly et al., 2003b).

Tradicionalmente se ha creído que el crecimiento de las levaduras no-*Saccharomyces*, principalmente de los géneros *Hanseniaspora*/*Kloeckera* y *Candida*, se limitaba a los dos o tres primeros días de fermentación, hasta alcanzar el 3% ó 4% de etanol, y que, transcurrido este tiempo, morían. Simultáneamente, las levaduras más alcohógenas de la especie *S. cerevisiae* iban aumentando su población, coexistiendo inicialmente con las no-*Saccharomyces*, hasta convertirse en dominantes. *S. cerevisiae* conduciría el proceso hasta el final, siendo la responsable última de la fermentación alcohólica debido a su alta tolerancia al etanol y su resistencia a temperaturas elevadas. La desaparición de las especies no-*Saccharomyces* se debería a su gran sensibilidad, en general, al etanol y a su escasa competitividad en medios con alta concentración en azúcares (Torija et al., 2001). También influiría en esta desaparición la presencia de algunos factores selectivos como anaerobiosis, interacción entre las diversas especies y cepas de levaduras, composición en nutrientes del mosto y las condiciones del proceso, principalmente la adición de anhídrido sulfuroso y la temperatura de fermentación (Fleet y Heard, 1993; Nissen et al., 2003; Pérez Nevado et al., 2006). De hecho, cuando en el mosto-vino la densidad es inferior a 1070-1060 mg/cm^3, en la mayor parte de las vinificaciones sólo se aíslan levaduras de la especie *S. cerevisiae* que

llegan a alcanzar durante ese proceso de fermentación alcohólica poblaciones de 10^6-10^8 UFC/ml (Fleet y Heard, 1993).

En la actualidad, gracias principalmente a la utilización de nuevas técnicas de detección de microorganismos en enología (Andorrá et al., 2011; Ivey y Phister, 2011), se puede afirmar que la ecología del proceso de fermentación es mucho más compleja de lo indicado anteriormente y que las levaduras no-*Saccharomyces* contribuyen de forma relevante a las características y a la complejidad aromática del producto final. En las primeras fases de la fermentación estas levaduras con bajo poder fermentativo pueden alcanzar poblaciones de 10^6-10^7 UFC/ml, comparables a las de *S. cerevisiae*, por lo que influirán en las características del vino debido a su actividad metabólica. Esta influencia se puede ver incrementada en fermentaciones alcohólicas llevadas a cabo a baja temperatura, ya que en este caso disminuye la sensibilidad al etanol de las levaduras no-*Saccharomyces* y pueden encontrarse en poblaciones similares a las de *S. cerevisiae* al final de la fermentación (Fleet, 2003).

Algunos autores han mostrado también la importancia que tiene la concentración de oxígeno en la supervivencia de *Torulaspora delbrueckii* y *Kluyveromyces thermotolerans* durante la fermentación alcohólica (Hansen et al., 2001), así como el efecto de las interacciones célula-célula y de la acumulación de compuestos tóxicos en la prevalencia de las levaduras no-*Saccharomyces* en esta fermentación (Nissen et al., 2003; Pérez-Nevado et al., 2006). Otros autores, como Pina et al. (2004) han comprobado que algunas levaduras como *H. guilliermondii* pueden presentar una resistencia al etanol similar a la de *S. cerevisiae*, lo que daría lugar a una presencia más prolongada en la fermentación alcohólica, con una mayor influencia en las características del vino elaborado. De igual forma, algunos autores han comprobado la permanencia de especies como *H. uvarum, Hanseniaspora opuntiae* e *Issatchenkia. terrícola* en fases avanzadas de la fermentación, después de que *S. cerevisiae* se impusiera como mayoritaria (Wang y Liu, 2013).

La presencia de las especies no-*Saccharomyces* durante la elaboración tiene importantes consecuencias en la calidad final del producto debido a que estas levaduras producen metabolitos secundarios que modifican la composición química y sensorial del vino (Más et al., 2004), especialmente su perfil gustativo y olfativo. Hasta hace unos años el aspecto que más se tenía en cuenta acerca de las levaduras no-*Saccharomyces* era la contribución negativa de algunas especies al aroma y al sabor de los vinos, como la

producción de grandes cantidades de acidez volátil por parte de *Kloeckera apiculata* (Jolly et al., 2003b). Algunos estudios antiguos consideraban a las levaduras no-*Saccharomyces* como levaduras alterantes porque a menudo se aislaban en vinos con fermentaciones paradas o vinos con características analíticas o sensoriales anómalas.

Para minimizar estos efectos negativos de las levaduras no-*Saccharomyces* que espontáneamente se desarrollaban en los mostos, en la década de 1980 se sistematizó la selección y posterior inoculación de los depósitos de vinificación con cepas de *S. cerevisiae* para conducir y controlar las fermentaciones. Estas inoculaciones, junto con la adición de anhídrido sulfuroso, eran las herramientas utilizadas en las bodegas para eliminar o controlar la población de otras levaduras diferentes a la inoculada, tanto del género *Saccharomyces* como no-*Saccharomyces*. En la actualidad, el uso de cultivos seleccionados de *Saccharomyces* es una práctica extendida en todas las zonas vitivinícolas del mundo, principalmente en las más nuevas, lo que ha contribuido a un mejor control de la vinificación, pero también a una simplificación de las comunidades microbianas que participan en las fermentaciones, lo que puede propiciar la pérdida de complejidad y cierta estandarización de los vinos elaborados.

Sin embargo, diversos estudios han demostrado la participación de cepas no-*Saccharomyces* tanto en fermentaciones espontáneas, como inoculadas (Combina et al., 2005; Zott et al., 2008). Se ha comprobado que, en algunos casos, la inoculación con Levaduras Secas Activas no suprime totalmente a las levaduras no-*Saccharomyces*, especialmente a las especies *K. apiculata* y *C. stellata*, que pueden estar presentes en varias fases de la fermentación (Mannazzu et al., 2007). La imposición de la cepa inoculada sobre la flora autóctona no ocurre siempre, ya que su implantación depende de las condiciones de la vinificación, de la cantidad y viabilidad del inóculo y su forma de uso, de las características fisiológicas y metabólicas de la levadura inoculada, y de la tecnología empleada en la vinificación (temperatura, nivel de anhídrido sulfuroso, etc.) (Ciani et al., 2010). La presencia de cepas indígenas de no-*Saccharomyces* durante la fermentación alcohólica la han corroborado estudios que utilizan métodos moleculares cultivo independientes (Xufre et al., 2006; Nisiotou et al., 2007), por lo que la importancia de las levaduras no-*Saccharomyces* sobre la fermentación no puede ser ignorada. Estos trabajos demuestran una vez más que la fermentación vínica es un proceso ecológicamente muy complejo donde no sólo se produce

un desarrollo sucesivo de no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces*, sino de diferentes cepas dentro de cada especie.

1.5. Contribución de las levaduras no-*Saccharomyces* a la calidad de los vinos

Multitud de estudios han comprobado la importante presencia y contribución de este grupo de levaduras en las fermentaciones alcohólicas y, como consecuencia, algunas especies han sido estudiadas en profundidad para aprovechar sus características metabólicas en forma de inóculos y así complementar la actividad de *S. cerevisiae*.

Se ha comprobado cómo algunas especies no-*Saccharomyces*, en comparación con *S. cerevisiae*, producen y secretan gran cantidad de enzimas: carbohidrolasas (celulasas, hemicelulasas, amilasas, pectinasas), glicosidasas (β-D apiosidasa, α-L-arabinofuranosidasa, α-L-rhamnosidasa, β-D-glucosidasas, β-D-xilosidasa), proteasas, lipasas, descarboxilasas, sulfito reductasas, β-glucanasas ó esterasas (Esteve-Zarzoso et al., 1998). Estos enzimas se liberan al espacio periplásmico y al medio fermentativo, donde pueden interaccionar con compuestos de la uva para mejorar la clarificación, filtración y estabilidad de los vinos, estabilizar el color, o producir compuestos aromáticos activos, contribuyendo de esta manera al aroma varietal o fermentativo del vino resultante (Lambrechts y Pretorius, 2000; Strauss et al., 2001; Hernández-Orte et al., 2008).

La actividad β-glucosidasa, por ejemplo, permite intensificar los aromas primarios de los vinos mediante la hidrólisis de precursores aromáticos de origen terpénico y, con ello, la liberación de terpenos durante la fermentación, puesto que, a diferencia de la glucosidasa procedente de las uvas, el enzima producido por las levaduras no es inhibido por la glucosa del mosto. Esta actividad β-glucosidasa ha sido encontrada en varias especies como *Pichia anomala* (Spagna et al., 2002; Mendes-Ferreira et al., 2001), *K. apiculata, Metschnikowia pulcherrima, Debaryomyces hansenii* y *Candida molischiana* (Fernández-González et al., 2003).

Del mismo modo, algunas de estas levaduras pueden incrementar la concentración de tioles volátiles, compuestos que proporcionan aromas afrutados agradables y que se

encuentran en algunas variedades de uva en forma no volátil unidos a la cisteína. Las levaduras producen durante la fermentación cisteína-liasa que libera los tioles incrementando el aroma varietal. Zott et al. (2011) demostraron que algunas cepas dentro de las especies *M. pulcherrima*, *T. delbrueckii* y *K. thermotolerans* eran capaces de liberar estos compuestos.

Además de la contribución a los aromas de los vinos, las levaduras también pueden degradar los polisacáridos de la uva gracias a otras actividades enzimáticas, mejorando los procesos de extracción, clarificación y filtración de los vinos. Investigaciones sobre la producción por parte de levaduras no-*Saccharomyces* de poligalacturonasa y β-D-xilosidasa mostraron que estas actividades están muy extendidas en estos microorganismos (Manzanares et al., 1999). También se han estudiado las actividades proteolítica y pectinolítica, favorecedoras del proceso de clarificación, en cepas de *K. apiculata* y especies de *Candida, Cryptococcus* y *Kluyveromyces* (Esteve-Zarzoso et al., 1998).

Algunos de los géneros estudiados han demostrado que poseen varias de estas propiedades deseables para una elaboración de calidad. Así se ha observado que los géneros *Hanseniaspora* y *Torulaspora* son buenos productores de enzimas como β-glucosidasa, pectinasas, proteasas y xilanasas (Maturano et al., 2012).

También se ha estudiado en estas levaduras otras propiedades de interés enológico. Algunas especies no-*Saccharomyces* podrían resultar de interés en base a su capacidad para producir metabolitos favorables que contribuyen a mejorar el bouquet final del vino (Viana et al., 2008), como algunas levaduras apiculadas, que aumentan la producción de ésteres sin aumentar la acumulación de productos azufrados (Moreira et al., 2008). En este sentido, la especie *Candida stellata* es una gran productora de glicerol, que aporta un matiz aterciopelado a los vinos.

Así mismo, se ha estudiado ampliamente la capacidad de las levaduras de la especie *Schizosaccharomyces pombe* para degradar casi totalmente el ácido málico de las uvas y producir etanol, mediante la denominada fermentación maloalcohólica, capacidad que también posee la levadura *Issatchenkia orientalis,* aumentando el pH del vino final (Comitini et al., 2011).

Pero quizás, la levadura no-*Saccharomyces* más estudiada en los últimos años por su interés enológico ha sido *T. delbrueckii,* antes conocida como *Saccharomyces rosei*, debido a

su posible uso en la fermentación de mostos con elevada concentración de azúcar, pues produce durante la vinificación menores niveles de acidez volátil y otros compuestos volátiles indeseables que *S. cerevisiae*. *T. delbrueckii* fermenta lentamente (Bely et al., 2008), produce niveles medios de etanol, aunque sobrevive a concentraciones elevadas (14%), y es capaz de potenciar el aroma del vino mediante la hidrólisis de precursores presentes en el mosto (Hernández-Orte et al., 2008). Ciani y Maccarelli (1998) indicaron que la fermentación alcohólica conducida por *T. delbrueckii* se caracteriza por una correlación positiva entre la producción de ácido succínico y etanol.

A pesar de todas estas características beneficiosas para elaborar un vino de calidad, las fermentaciones conducidas únicamente con levaduras no-*Saccharomyces* han dado lugar a vinos que contienen numerosos metabolitos negativos, como ácido acético, acetaldehído, acetoína y acetato de etilo, lo que las incapacita como cultivos iniciadores únicos. Además, la mayoría de estas levaduras tienen baja capacidad fermentadora, baja producción de alcohol y baja resistencia al anhídrido sulfuroso, por lo que el uso de levaduras no-*Saccharomyces* como inóculos únicos, en general, es inviable.

Sin embargo, en fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae* se han observado resultados satisfactorios y en los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios con distintas especies no-*Saccharomyces* para su posible uso en forma de inóculos mixtos con *S. cerevisiae*.

1.6. Utilización de inóculos mixtos *Saccharomyces*/no-*Saccharomyces*

A diferencia de los ensayos de vinificación inoculados únicamente con especies no-*Saccharomyces*, en fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae*, parece que algunas características enológicas negativas de las no-*Saccharomyces* podrían no expresarse o ser modificadas por la presencia de otras levaduras.

Así, en diversos estudios sobre el posible uso de estas levaduras en inóculos mixtos (Jolly et al., 2003a y c) se ha comprobado cómo los vinos inoculados con dos especies (una

del grupo no-*Saccharomyces* junto a *S. cerevisiae*) se valoran como de mejor calidad que los inoculados sólo con *S. cerevisiae*.

El empleo de inóculos mixtos no-*Saccharomyces*/*Saccharomyces* se ha propuesto como un método para simular la fermentación natural del mosto, pero en condiciones más controladas, y también para conferir mayor complejidad al vino (Milanovic et al., 2012). Es una tecnología estudiada desde hace tiempo, pero recientemente se han desarrollado numerosos trabajos de investigación en esta línea, pues muchos autores han llegado a la conclusión de que las levaduras no-*Saccharomyces* pueden dar lugar a vinos con aromas más complejos y de mayor calidad sin producir compuestos negativos (Soden et al., 2000; Bely et al., 2008; Viana et al., 2008, Ciani et al., 2010). Por ello, varios equipos de investigación han estudiado fermentaciones conducidas por varias levaduras no-*Saccharomyces* (*H. uvarum*, *T. delbrueckii*, *K. thermotolerans*, *Pichia kluyveri*) junto con *S. cerevisiae*, bajo diferentes condiciones de vinificación (Anfang et al., 2009; Andorrá et al., 2010; Izquierdo et al., 2011; Azzolini et al., 2012), lo que ha favorecido la selección de nuevos cultivos no-*Saccharomyces* capaces de conducir la fermentación alcohólica junto con *S. cerevisiae*.

Las levaduras apiculadas del género *Kloeckera* se desarrollan en gran proporción al inicio de las fermentaciones espontáneas. Por ello, han sido ampliamente estudiadas para ser usadas en coinóculos. Moreira et al. (2008) plantearon que el crecimiento de levaduras apiculadas durante los primeros días de fermentación favorece el aroma del vino al aumentar la producción de ésteres y disminuir la de alcoholes superiores, y principalmente por no favorecer la formación de compuestos azufrados volátiles. Estos mismos autores propusieron la selección de cepas dentro de la especie *H. uvarum* para su uso en cultivos mixtos (Moreira et al., 2011), puesto que el vino obtenido es más complejo organolépticamente.

Por otra parte, *C. stellata* es una levadura altamente productora de glicerol, de ácido succínico y de acetato de etilo, aunque no de etanol ni de ácido acético. Algunos ensayos llevados a cabo en bodega comercial indicaron que en cultivos mixtos con *S. cerevisiae*, mejoraba el aroma de los vinos (Soden et al., 2000). El uso combinado de *S. cerevisiae* con alguna cepa de *C. stellata*, reclasificada como *Starmerella bombicola* (Spiczki et al., 2005) y también de *Candida zemplinina* y *Candida cantarelli*, se han utilizado para incrementar el contenido en glicerol (Comitini et al., 2011) y en alcoholes superiores (Andorrá et al., 2010). *C. stellata* y *C. zemplinina,* debido a su carácter fructolítico, podrían ser útiles para equilibrar

el carácter glucolítico de *Saccharomyces* y resolver problemas asociados a fermentaciones lentas o paradas fermentativas (Magyar y Tóth, 2011).

Varios autores (Bely et al., 2008; Renault et al., 2009), han evaluado también el impacto de cultivos mixtos o secuenciales entre *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* en fermentaciones de mostos con alta concentración de azúcar para reducir el contenido en ácido acético. Algunas cepas de *T. delbrueckii* se encuentran disponibles en el mercado para su uso en fermentaciones secuenciales o cultivos mixtos con el fin de reducir la acidez volátil y aumentar el perfil aromático (Lallemand, 2010).

En estudios realizados sobre la asociación entre *M. pulcherrima* y *S. cerevisiae*, Comitini et al. (2011) encontraron una disminución significativa de la acidez volátil. Sin embargo, Jolly et al. (2003c) no detectaron cambios relevantes en relación con el cultivo puro de *S. cerevisiae*. García et al. (2002), por su parte, propusieron el uso de un cultivo mixto formado por *Debaryomyces vanrijii* y *S. cerevisiae* para incrementar el contenido en compuestos volátiles, particularmente el geraniol, en vinos de moscatel.

La cofermentación entre *S. cerevisiae* y *P. kluyveri* se ha propuesto para incrementar las concentraciones en tioles varietales en Saugvignon Blanc (Anfang et al., 2009), y *Pichia fermentans* también ha sido propuesta para fermentaciones *multistarter* por su positiva influencia en la composición de compuestos volátiles (Clemente-Jiménez et al., 2005).

Uno de los usos de cultivos mixtos más investigados en enología es la desacidificación biológica mediante la utilización de la especie *S. pombe* seguida de *S. cerevisiae*. Además de *S. pombe*, alguna cepa de *I. orientalis* degrada el ácido málico rápidamente (Seo et al., 2007) y también se ha propuesto para reducir su contenido en los vinos en cultivo mixto con *S. cerevisiae* (Kim et al., 2008).

Para conseguir el efecto contrario, es decir, la acidificación biológica del vino, se ha propuesto el uso de *Lachancea thermotolerans* (*K. thermotolerans*), levadura altamente productora de acidez fija en forma de ácido L(+) láctico, en cultivo mixto con *S. cerevisiae*, consiguiendo un 70% de incremento en la acidez total y una reducción de 0,3 unidades de pH (Gobi et al., 2013; Kapsopoulo et al., 2005, 2007).

Por otra parte, Palomero et al. (2009) estudiaron diversas especies no-*Saccharomyces* para ser utilizadas en etapas diferentes a la fermentación dentro del proceso de vinificación, concretamente en la crianza sobre lías de vinos tintos. También en esta línea, Lombardo y Guarrera (2012) analizaron el efecto de coinóculos formados por *D. hansenii* y *Saccharomyces bayanus* en la segunda fermentación de la elaboración de vinos espumosos por el método Champenoise.

Otra de las líneas de investigación más prometedoras es la seguida por González et al. (2013), que sugieren el empleo de levaduras no-*Saccharomyces* junto con *S. cerevisiae* para elaborar vinos con menor grado alcohólico, de gran interés en la situación actual de calentamiento global y cambio climático.

También se han estudiado inóculos formados por varias especies no-*Saccharomyces* para simular condiciones distintas de vinificación (fermentación natural, maceración prefermentativa), y se ha comprobado que pueden influir en el desarrollo de la fermentación y en la composición del vino (Zott et al., 2011). Así, Herráiz et al. (1990) analizaron la influencia en cultivo puro, mixto y secuencial de *K. apiculata*, *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* en la composición aromática de los vinos y Ciani et al (2006) optimizaron el cultivo formado por *T. delbrueckii*, *K. thermotolerans* y *S. cerevisiae*.

Todo lo expuesto indica que las levaduras enológicas no-*Saccharomyces* tienen características específicas, que no están presentes en *S. cerevisiae* y que pueden mejorar la calidad de los vinos analítica y sensorialmente mediante la utilización de cultivos mixtos con *S. cerevisiae*. Estas especies no-*Saccharomyces* tienen un potencial uso en beneficio de la calidad de los vinos, siempre y cuando se conozca en profundidad su metabolismo y su comportamiento en inoculaciones mixtas.

El primer paso para poder hacer uso de estas características beneficiosas de las levaduras no-*Saccharomyces* utilizadas en forma de Levaduras Secas Activas es el conocimiento de las especies y, dentro de ellas, de la diversidad de cepas presentes en nuestros ecosistemas, ya que cada una presenta diferentes comportamientos enológicos (Romano et al., 2003b; Comitini et al., 2011). Así, Renault et al. (2009) encontraron en 21 cultivos puros de *T. delbrueckii* al menos 19 clones distintos con una gran variabilidad de comportamiento fermentativo.

1.7. Levaduras alterantes de la calidad de los vinos

Tradicionalmente, las especies de levaduras no-*Saccharomyces* se han asociado a la producción de acidez volátil, malos gustos y defectos en el vino. Los principales microorganismos causantes de los defectos incluyen especies de los géneros *Brettanomyces, Candida, Hanseniaspora, Pichia y Zygosaccharomyces* (Du Toit y Pretorius, 2000), y también *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* y *Saccharomycodes* (Romano et al., 2003a). Estas levaduras pueden encontrarse tanto en la fermentación como durante el envejecimiento y conservación del vino y pueden afectar negativamente a la calidad del mismo.

La definición de levadura alterante no es fácil en la industria alimentaria. Boekhout et al. (2002) indicaban que aquellas levaduras capaces de sobrevivir en los alimentos, pero que son incapaces de crecer y, por ello, no afectan a las características sensoriales, se consideran levaduras *adventicias* o *inocentes*, y sólo las responsables de cambios indeseables deben llamarse levaduras alterantes. Para los tecnólogos de alimentos el término de levadura alterante se aplica sólo cuando la levadura es capaz de alterar un alimento que ha sido procesado de acuerdo con las normas de Buenas Prácticas de Procesado. En el caso de las bebidas alcohólicas fermentadas como el vino, este concepto es todavía más complejo, porque cualquier levadura capaz de cambiar las características sensoriales del vino puede ser considerada como levadura alterante (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). En la industria enológica, donde la fermentación alcohólica transcurre con la presencia de muchas especies distintas de levaduras que producen un elevado número de compuestos, es difícil dibujar una línea que separe la actividad beneficiosa de la actividad alterante. Por este motivo, las levaduras alterantes raramente se buscan durante la fermentación, pero sí durante el almacenamiento o envejecimiento (Wedral et al., 2010) y también durante el embotellado (Baleiras-Couto et al., 2011).

En la actualidad, las alteraciones del vino han tomado mayor relevancia debido a las nuevas tecnologías de procesado y a la tendencia a reducir el uso de conservantes, principalmente de anhídrido sulfuroso. El entorno de la producción de vino puede dividirse en dos partes fundamentales, el viñedo y la bodega. Un profundo conocimiento de estos dos ecosistemas es esencial para establecer el origen de las levaduras de alteración, así como lo ha sido para conocer las que pueden contribuir a mejorar la calidad del producto final.

La uva es la primera fuente de entrada de levaduras alterantes en la bodega. Se han encontrado en cantidades elevadas levaduras de los géneros *Brettanomyces* y *Zygosaccharomyces* en uvas con cierto grado de podredumbre (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003). Dentro de la bodega, estas levaduras alterantes proceden de las materias primas auxiliares, los insectos, las superficies y equipos que las albergan, y también del aire, que las moviliza. Su proliferación en los mostos y vinos, así como su crecimiento en superficies y materiales, dependerá de la higiene de la bodega y también de las características de cada vino, que determinará la evolución de los microorganismos en el mismo. Kunkee y Bisson (1993) agruparon las levaduras alterantes del vino en cuatro tipos: *S. cerevisiae* (capaz de fermentar vinos dulces embotellados), *Hansenula* spp., *Kloeckera* spp., *Pichia* spp., *Metschnikowia* spp. y *Debaryomyces* spp. (levaduras formadoras de velo), *Z. bailii* (levadura refermentadora) y *Brettanomyces bruxellensis* (levadura productora de etilfenoles). Los efectos más comunes de alteración son la producción de gases y la formación de velos, enturbiamientos y precipitados durante la conservación de los vinos, y la producción de compuestos que pueden generar malos gustos y olores en cualquier etapa de la vinificación.

Más recientemente, Loureiro y Malfeito-Ferreira (2003) clasificaron las levaduras habitualmente presentes en el ecosistema de las bodegas y potencialmente contaminantes del vino en tres tipos: levaduras aerobias que son contaminantes comunes y que no tienen capacidad para desarrollarse y alterar el vino (*Rhodotorula* spp., *Cryptococcus* spp., *D. hansenii* y *A. pullulans*); levaduras de metabolismo aerobio o débilmente fermentativo que crecen abundantemente en el vino, y que son conocidas por formar velos en depósitos sin llenar completamente y en vinos poco sulfitados (*Pichia membranaefaciens*, *Pichia anomala* y *Candida* spp.), y que, debido a su metabolismo oxidativo, colonizan rápidamente superficies contaminadas con residuos de vino, y por lo tanto son indicadoras del nivel de higiene de la bodega; y levaduras que son consideradas como las más peligrosas para los vinos como *Dekkera/Brettanomyces* spp., *Z. bailii* y *Saccharomycodes ludwigii*. Algunos estudios han demostrado que estas últimas son contaminantes de los equipos de las bodegas (Renouf et al., 2007a) y de los vinos embotellados, tanto jóvenes como envejecidos en barrica (Renouf et al., 2007b).

Las levaduras del género *Zygosaccharomyces* se asocian normalmente con la alteración de alimentos y bebidas ácidas y con alto contenido en azúcares fermentables. No son contaminantes habituales de las bodegas productoras de vinos secos, aunque son temidas

en las empresas productoras de mostos concentrados y en las que elaboran vinos dulces. Su peligrosidad, sobre todo de la especie *Z. bailii*, se debe a su carácter osmófilo, a su elevada resistencia al anhídrido sulfuroso y al ácido sórbico, y a su capacidad refermentadora (Kurtzman et al., 2011). Barata et al. (2008) observaron que la presencia de levaduras de esta especie está asociada a uvas con podredumbre ácida y que sobreviven a la fermentación con *S. cerevisiae*, debido a su elevada tolerancia al etanol.

S. ludwigii es una levadura apiculada que raramente se encuentra en los mostos, pero que aparece en los productos sulfitados debido a su gran resistencia al anhídrido sulfuroso. Es capaz de generar cantidades elevadas de etanol, de forma similar a *S. cerevisiae*, sin producir mucho ácido acético, pero también genera grandes cantidades de compuestos (principalmente acetoína, acetato de etilo y acetaldehído) que afectan negativamente a la calidad final del vino (Ciani y Maccarelli, 1998). Estas levaduras son resistentes al quitosano, a la irradiación y al dimetildicarbonato, por lo que es muy difícil erradicarlas de las bodegas (Kurtzman et al., 2011).

Pero las levaduras más temidas en el sector enológico pertenecen a la especie *Dekkera bruxellensis* o su forma anamorfa *B. bruxellensis*. Estas levaduras son responsables de importantes pérdidas económicas en la industria del vino debido a su capacidad para deteriorarlo al producir etilfenoles (Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2006). Durante la última década estas levaduras han sido objeto de numerosos estudios para tratar de entender su metabolismo alterante y establecer medidas de control (Suárez et al., 2007). La presencia de *Brettanomyces* en vinos constituye una problemática que ha adquirido gran importancia a nivel internacional, ya que todas las zonas vitivinícolas se han visto afectadas en mayor o menor medida. Según Gerland (2006), en Borgoña el 50% de los vinos de crianza y el 25% de los vinos embotellados estaban contaminados y en Australia, en el período 1996-2000, el 75% de los vinos analizados resultaron estar alterados por esta levadura. Aunque no se dispone de cifras exactas, es de suponer que en la D.O.Ca. Rioja y en España, este problema esté también muy extendido, debido al elevado porcentaje de vinos tintos producidos con crianza, ya que este tipo de vinos es el más susceptible de sufrir deterioro por *Brettanomyces*.

La especie *B. bruxellensis* es un microorganismo ubicuo que puede llegar a la bodega, como otras levaduras no-*Saccharomyces*, a través de las uvas, el vino, los depósitos y equipos de la misma e, incluso, por medio de los insectos (Licker et al., 1999) y el aire. Esta levadura

se desarrolla sobre los vinos principalmente durante la crianza en barrica, y suele alcanzar su máxima densidad de población 5 ó 7 meses después de la vinificación (Fugelsang y Zoecklein, 2003). Son levaduras resistentes al etanol, hasta niveles de 15-16%, en función de la cepa, y son capaces de formar grandes cantidades de ácido acético (Vigentini et al., 2008) y aminas biógenas (Caruso et al., 2002). Además, su desarrollo en el vino conduce a la aparición de olores fenólicos y animales que recuerdan al cuero, sudor, caucho, farmacia o establo, defecto conocido como "carácter Brett" (Chatonnet et al., 1993; Rodrigues et al., 2001). Cuando la población de *B. bruxellensis* en el vino supera el nivel de 10^2-10^3 UFC/ml hay un alto riesgo de acumulación excesiva de fenoles volátiles, lo que daría lugar a la detección de estos olores fenólicos.

Se ha descrito la presencia de levaduras del género *Brettanomyces* y, particularmente la especie *B. bruxellensis*, en la uva, al inicio de la fermentación alcohólica y, sobre todo, en el periodo de conservación de los vinos, fundamentalmente durante el periodo de envejecimiento de los vinos tintos en barricas de roble. Estas levaduras pueden contaminar las barricas de madera, los depósitos de hormigón, etc., lo que requiere atentos tratamientos de limpieza o la renovación completa de los recipientes. También pueden desarrollarse en botella, dando lugar a defectos que se aprecian en el vino cuando se consume. Su presencia no es fácilmente detectable y la mejor manera de evitar la contaminación es la prevención. Los altos valores de pH y los bajos niveles de anhídrido sulfuroso son los motivos principales que permiten el desarrollo de *Brettanomyces* en el vino (Trioli, 2009).

En general, parece necesario realizar estudios más profundos del ecosistema del viñedo y de la bodega para establecer el origen de las levaduras de alteración, sus rutas de diseminación, los puntos críticos de la infección y su control.

1.8. Diseminación de las levaduras enológicas en la bodega

Como ya se ha expuesto, el origen de los microorganismos asociados a la vinificación y la vía por la cual llegan hasta el mosto es una cuestión debatida desde hace tiempo. En la actualidad se admite que tienen dos posibles orígenes: la uva y el material de la bodega (Fleet y Heard, 1993; Mortimer y Polsinelli, 1999). Pero, además de las uvas y los equipos de bodega, actualmente existe una tercera vía por la que las levaduras pueden llegar al mosto,

que es la adición exógena o inoculación con Levaduras Secas Activas. Esta práctica es común en las nuevas regiones productoras de vinos y crece con fuerza en las más tradicionales. La introducción de estas levaduras en algún depósito permite su posterior diseminación por el ecosistema de las bodegas utilizando las mismas rutas que las cepas indígenas (Constantí et al., 1997; Beltrán et al., 2002).

Además de las uvas, sobre el equipamiento de la bodega (tolva, estrujadora, despalilladora, depósitos, etc.) también existen levaduras que al entrar en contacto con el mosto, lo contaminan y, si las condiciones lo permiten, comienzan a multiplicarse. Estas levaduras proceden de vendimias y fermentaciones anteriores llevadas a cabo en la bodega.

Desde hace años, los bodegueros han venido observando que las primeras fermentaciones espontáneas que tienen lugar en la bodega cada campaña, suelen ser más largas que las que suceden a continuación (Peynaud, 1989). La razón podría deberse al aumento de microorganismos que se produce en el primer depósito, su posterior diseminación por la bodega y la llegada en gran cantidad a otros depósitos, por lo que las fermentaciones arrancan más rápidamente y transcurren a mayor velocidad. Granchi et al. (2007) sugirieron que las cepas de *S. cerevisiae* que dominan la fermentación del primer depósito de cada vendimia, invaden el ambiente de la bodega y producen una inoculación natural en las fermentaciones siguientes. Es conocido que la diseminación de los microorganismos en la bodega tiene lugar por la maquinaria e instrumental de la misma, por los trabajadores, por los insectos y también por el aire (Garijo et al., 2008, 2009). La supervivencia de los microorganismos en el ecosistema de la bodega y su desarrollo está directamente relacionado con las condiciones ambientales (temperatura, humedad, disponibilidad de nutrientes, etc.). El aire por sí mismo no permite el desarrollo de los microorganismos, puesto que estos sufren condiciones de estrés por calor, humedad, luz y falta de nutrientes. Así que el aire sólo actúa como un medio de transporte o soporte de microorganismos hasta que estos caen y se depositan en las superficies de alrededor (Curiel et al., 2000). Según estos autores los microorganismos pueden viajar por el aire de tres formas: adheridos a partículas de polvo, adheridos a gotas de líquido o como partículas individuales.

El análisis del aire es frecuente en algunas industrias alimentarias (Salustiano et al., 2003), principalmente en las zonas de envasado aséptico de los alimentos, donde la presencia de microorganismos en el ambiente supone una vía de contaminación y alteración de los

mismos. La necesidad de controlar la calidad microbiológica del aire, para asegurar que los productos alimenticios permanezcan seguros y sanos en todas las etapas de su proceso, está bien establecida en fábricas de alimentos. Concentraciones de 100 a 10.000 microorganismos/m^3 de aire son bastante normales (Curiel et al., 2000). A pesar de ello, este tipo de análisis es, hasta el momento, prácticamente desconocido en las bodegas y tampoco son frecuentes los trabajos de investigación en este campo.

Una de las primeras referencias encontradas sobre los microorganismos presentes en el aire de las bodegas es la de Beech (1993), en un estudio sobre sidra, donde encontró relación entre la exposición del líquido al aire y la contaminación con levaduras de la especie *B. bruxellensis*. Posteriormente, Connel et al. (2002) encontraron estas levaduras en muestras de aire procedentes de distintas zonas de una bodega comercial (vinificación, prensado, barricas y embotelladora), indicando que esta levadura alterante podía diseminarse por la bodega a través de corrientes de aire. Estos autores detectaron poblaciones de *B. bruxellensis* de entre 12 y 400 colonias/m^3 de aire en la zona de embotellado y prensado respectivamente. Anteriormente, Donelly (1977) llevó a cabo un estudio para determinar la cantidad y tipos de microorganismos presentes en el aire de la zona de embotellado de una bodega, llegando a la conclusión de que las principales fuentes que proporcionaban microorganismos al aire, y por ello las principales causas de contaminación durante el embotellado, eran la llenadora, el vino derramado, el desagüe y el aire exterior. Al limpiar estas superficies o eliminar la entrada de aire, la concentración de microorganismos en el aire disminuía paralelamente. Según estos datos, los microorganismos presentes en el aire parecen ser representativos de aquellos presentes en el vino o en las superficies de las instalaciones próximas. Este autor identificó en el aire tanto levaduras como bacterias lácticas y acéticas pertenecientes a los géneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula* y *Serratia*. Garijo et al. (2008, 2009) demostraron que el aire es una vía de diseminación de levaduras y bacterias lácticas durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica en las bodegas, y también que la manipulación de vinos cargados de microorganismos supone un incremento notable de estos en el aire y una vía de contaminación de otros vinos.

Todo lo expuesto anteriormente muestra que la vinificación es un proceso extremadamente complejo desde un punto de vista microbiológico y, en concreto, en la participación de distintas especies de levaduras desde que la uva está en la viña hasta el momento en que se pone un vino embotellado en el mercado.

Solo el conocimiento de las levaduras presentes en los distintos momentos y lugares permitirá avanzar en la selección de especies y cepas que mejoren la calidad del vino obtenido, y, también, valorar los riesgos de alteración que las especies presentes en nuestros ecosistemas puedan suponer.

Referencias bibliográficas

Albertin, W., Miot-Sertier, C., Bely, M., Marullo, P., Coulon, J., Moine, V., Colonna-Ceccaldi, B., Masneuf-Pomarede, I. 2014. Oenological prefermentation practices strongly impact yeast population dynamics and alcoholic fermentation kinetics in Chardonnay grape must. International Journal of Food Microbiology.178:87-97.

Andorrá, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J.M., Esteve-Zarzoso, B. 2010. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentation. European Food Research Technology 231, 215-224.

Andorrá, I., Monteiro, M., Esteve-Zarzoso, B., Albergaria, H., Mas, A. 2011. Analysis and direct quantification of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* populations during alcoholic fermentation by fluorescence *in situ* hybridization, flow cytometry and quantitative PCR. Food Microbiology 28, 1483-1491.

Anfang, N., Brajkovich, M., Goddard, M.R. 2009. Co-fermentation with *Pichia kluyvery* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. Australian Journal of Grape and Wine Research 15, 1-8.

Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C., Zapparoli, G. 2012. Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. European Food Research Technology 235, 303-313.

Baleiras-Couto, M.M., Gomes, A.S., Casal, M., Duarte, F.L. 2011. Survey of yeast diversity during wine bottling processes using restriction analysis of 26S ribosomal DNA (rDNA).Australian Journal of Grape and Wine Research 18, 39-42.

Barata, A., González, S., Malfeito-Ferreira, M., Querol, A., Loureiro, V. 2008. Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. FEMS Yeast Research 8, 1008-1017.

Barata, A., Malfeito-ferreira, M., Loureiro, V. 2012. The microbial ecology of wine grape berries. International Journal of Food Microbiology 153, 243-259.

Beech, F.W. 1993. Yeast in cider – Making. In: The yeast. Rose and Harrison Eds., pp 169-213. Academic Press, London.

Beltrán, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozes, N., Mas, A. 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. Syst. Appl Microbiol., **25,** 287-293.

Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D. 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. International Journal of Food Microbiology 122, 312-320.

Blouin, C., Peynaud, É. 2004. Enología Práctica. Conocimiento y elaboración del vino. Ediciones Mundi-Prensa.

Boekhout, T., Robert, V., Smith, M., Stalpers, J., Yarrow, D., Boer, P., Gijswijt, G., Kurtzman, C., Fell, J., Guého, E., Guillot, J., Roberts, I. 2002. Yeast of the world. Morphology, fisiology, Sequences and Identification. CD-ROM from ETI Information Services, Wokingham, UK.

Carrascosa, A., Muñoz, R., González, R. 2011. Molecular Wine Microbiology. Academic Press. Elsevier.

Carrascosa, A.V., Muñoz, R., González, R. 2005. Microbiología del Vino. AMV, Madrid (España).

Caruso, M., Fiore, C., Contursi, M., Salzano, G., Paparella, A., Romano, P. 2002. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18, 159-163.

Chatonnet, P., Dubordieu, D., Boidron, J. 1993. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. Journal of Science and Food Agriculture 62, 101-202.

Ciani, M., Maccarelli, F. 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. World Journal of Microbiology and Biotechnology 14, 199-203.

Ciani, M., Beco, L., Comitini, F. 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeasts fermentations. International Journal of Food Microbiology 108, 239-245.

Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P. 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. FEMS Yeast Research 10, 123-133.

Clemente-Jiménez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Heras-Vazquez, F.J.L., Rodríguez-Vico, F. 2005. Influence of sequential mixtures on wine fermentation. International Journal of Food Microbiology 98, 301-308.

Clemente-Jiménez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F.J., Rodríguez-Vico, F. 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. Food Microbiology, 21: 149-155.

Combina M., Elia, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., Martínez, C. 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. International Journal of Food Microbiology 99, 237-243.

Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. 2011. Selected non- *Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiology 28, 873-882.

Connell, L., Stender, H., Edwards, C.G. 2002. Rapid detection of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis. American Journal of Enology and Viticulture 53, 322-324.

Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Más, A., Guillamón, J.M. 1997. Analysis of yeasts populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. Am. J. Enol. Vitic. **48**, 339-344.

Curiel, G.J., Van Eijk, H.M.J., Lelieveld, H.L.M. 2000. Risk and control of airborne contamination. In: Robinson, R.K., Butt, C.A., Patel, P.D. (Eds.), Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press, London, pp. 1816–1822.

Donnelly, D. M. 1977. Airborne microbial contamination in a winery bottling room. American Journal of Enology and Viticulture, **28**, 176-181.

Du Toit, M., Pretorius, I.S. 2000. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature´s own arsenal- A review. S. Afr. J. Enol. Vitic., **21**: 74-96.

Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramón, D., Querol, A. 1998. The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. Int. Microbiology, 1: 143-148.

Fernández-González, M., Di Stefano, R., Briones, A. 2003. Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species. Food Microbiology, 20: 35-41.

Flanzy, C. 2000. Enología: fundamentos científicos y tecnológicos. AMV Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa.

Fleet, G. H. 2008. Wine yeasts for the future. FEMS Yeast Research 8, 979-995.

Fleet, G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. Int. J. Food Microbiol., 86(1-2), 11-22.

Fleet, G.H. 1993. Wine microbiology and biotechnology. Ed. Harwod Academic Publishers, Switzerland, pp. 510.

Fleet, G.H., Heard, G.M. 1993. Yeast: growth during fermentation. In: Wine microbiology and biotechnology. Ed. Harwood Academic Publishers, Switzerland, pp. 27-54.

Fleet, G.H., Laffon-Lafourcade, S., Ribèreau-Gayon, P. 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. Appl. Environ. Microbiol., 48, 1034-1038.

Fleet, G.H., Prakitchaiwattana, C.J., Beh, A., Heard, G.M. 2002. The yeasts ecology of wine grapes. In: Ciani M (Ed) Biodiversity and Biotechnology of wine yeasts. Res Signpost, Kerala, pp 1-17.

Francesca, N., Canale, D.E., Settanni, L., Moschetti, G. 2012. Dissemination of wine-related yeasts by migratory birds. Environm. Microbiol. Reports, 4(1), 105-112.

Fugelsang, K.C., Zoecklein, C.G. 2003. Population dynamics and effects of *Brettanomyces bruxellensis* strains on Pinot noir (*Vitis vinifera* L.) wines. American Journal of Enology and Viticulture 54, 294-300.

García, A., Carcel, C., Dalau, L., Samson, A., Aguera, E., Agosin, E., Gunata, Z. 2002. Influence of a mixed culture with *Debaryomyces vanriji* and *Saccharomyces cerevisiae* on the volatiles in a Muscat wine. Journal of food Science 67, 1138-1143.

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.

Garijo, P., Santamaría, P., López, R., Sanz, S., Olarte, C., Gutiérrez, A.R. 2009. Presence of lactic acid bacteria in the air of a winery along one vintage. International Journal of Food Microbiology 136, 142-146.

Garijo, P. 2010.Estudio de las levaduras presentes en las instalaciones de una bodega comercial. Comparación de los clones de *Saccharomyces cerevisisae* aislados de instalaciones, depósitos en fermentación y en el aire. Trabajo para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados. Universidad de La Rioja.

Gerland, C. 2006. Actualización de los conocimientos sobre *Brettanomyces/Dekkera*. Ciclo de conferencias Palencia-Logroño.

Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. 2013. *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. Food Microbiology 33, 271-281.

González, R., Quirós, M., Morales, P. 2013. Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: A promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. Trends in Food Science and Technology 29, 55-61.

Granchi, L., Augruso, S., Ganucci, D., Vicenzini, M. 2007. Biodiversité genomique de *Saccharomyces cerevisiae* pendant la fermentation spontanée du vin conditionnée par le progresión de la vendage dans la cave. Proceedings XXXth OIV World Congress, Budapest.

Guillamón Navarro, J.M. 1996. Estudio ecológico de la fermentación alcohólica mediante la utilización de marcadores moleculares. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.

Guzzon, R., Franciosi, E., Larcher, R. 2014. A new resource from traditional wines: characterization of the microbiota of "Vino Santo" grapes as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea.* Eur. Food Res. Technol. 239:117–126.

Hansen, E.H., Nissen, P., Sommer, P., Nielsen, J.C., Arneborg, N. 2001. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Applied Microbiology 91, 541-547.

Hernández-Orte, P., Cerosimo, M., Loscos, N., Cacho, J., García-Moruno, E., Ferreira, V. 2008. The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. Food Chemistry 107, 1064-1077.

Herraiz, T., Reglero, G., Herraiz, M., Martín-Alvarez, P.J., Cabezudo, M. 1990. The influence of the yeast and type of culture on the volatile composition of wine fermented without sulfur dioxide. American Journal of Enology and Viticulture 41, 313-318.

Hidalgo, J. 2002. Tratado de Enología. Tomo I. Ed. Mundi prensa, Madrid, pp. 752.

Hidalgo Togores, J. 2003. Tratado de Enología. Ediciones Mundi-Prensa.

Ivey, M., Phister, T.G. 2011. Detection and identification of microorganisms in wine: Biotechnology 38, 1619-1634.

Izquierdo Cañas, P.M., Palacios García, A.T., García Romero, E. 2011. Enhancement of flavour properties in wines using sequential inoculations of non-*Saccharomyces* (*Hansenula* and *Torulaspora*) and *Saccharomyces* yeast starter. Vitis 50, 177-182.

Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S. 2003a. The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. S. Afr. J. Enol. Vitic., 24, Nº 2: 55-62.

Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S. 2003. The ocurrence of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. S. Afr. Enol. Vitic., 24, Nº 2: 35-42.

Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S. 2003. The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin Blanc wine. S. Afr. Enol. Vitic., 24, Nº 2: 63-69.

Kapsopoulou, K., Kapaklis, A., Spyropoulos,H. 2005. Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast *Kluyveromyces thermotolerans* isolated in Greece. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21, 8-9.

Kapsopoulou, K., Mourtzini, A., Anthoulas, M., Nerantzis, E. 2007. Biological acidification during grape must fermentation using mixed cultures of *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23, 735-739.

Kim, D-H., Hong, Y-A., Park, H-D. 2008. Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic content in wine. Biotechology Letters 30, 1633-1638.

Kunkee, R., Bisson, L. 1993. Winemaking yeasts. 2nd ed. In: Rose, A.H., Harrison, J.S., (Eds), The Yeasts, vol 5. Academic Press, London, pp 69-127.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekjout, T. 2011. The yeast. A taxonomic study, vol. 2.

Kurtzman, C.P. y Fell, J.W. 1998. The yeasts, a taxonomic study 4th edn, Elsevier Science, Amsterdam.

Lallemand, 2010. Winemaking update. http://www.lallemandwine.com

Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. 2000. Yeast and its importance to wine aroma-A review. S. Afr. J. Enol. Vitic., 21, 97-129.

Licker, J.L., Acree, T.E., Henick-Kling, T. 1999. What is "Brett" (*Brettanomyces*) flavor? A preliminary investigation. In: Chemistry of wine flavor. Waterhouse and Ebeler Eds., pp. 96-115. American Chemistry Society, Washington, DC.

Lombardo, A., Guarrera, N. 2012. Convectional versus non-convectional selected wild yeasts effects on Champenoise method sparkling wine aroma. Rivista di Viticoltura e di Enologia 1, 39-52.

Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. International Journal of Food Microbiology 86, 23-50.

Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. 2006. Spoilage activities of *Dekkera/Brettanomyces* spp. In: Blackburn, C. (Ed.), Food spoilage microorganisms chapter 13. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp 354-398.

Magyar, I., Tóth, T. 2011. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata, Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiology 28, 94-100.

Mannazzu, I., Angelozzi, D., Clementi, F., Ciani, M. 2007. Dominanza di starter commerciali nel corso di fermentazioni inoculate: analisi di trentasei vinificazioni industriali. Vignevini 34, 61-64.

Manzanares, P., Ramón, D., Querol., A. 1999. Screening of non- *Saccharomyces* wine yeasts for the production of β-D-xilosidase activity. International Journal of Food Microbiology 46, 105-112.

Martini, A. 2003. Biotechnology of natural and winery-associated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. International Microbiology 6, 207-209.

Martini, A. 1993. Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J. Wine Res. 4(3), 165-176.

Mas, A., Hierro, N., Guillamón, J.M., González, A., Poblet, M. y Rozés, N. 2004. Nuevas técnicas de identificación, detección y cuantificación de levaduras de importancia en enología. Tecnología del vino, 15, 65-72.

Maturano, Y.P., Rodríguez Assaf, L.A., Toro, M.E., Nally, M.C., Vallejo, M., Castellanos de Figueroa, L.I., Combina, M., Vazquez, F. 2012. Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. Int. Journal of Food Microbiology 155, 43-50.

Mendes Ferreira, A., Clímaco, M.C., Mendes Faia, A. 2001. The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components- a preliminary study. J. Appl. Microbiol., 91, 67-71.

Mercado, L., Dalcero, A., Masuelli, R., Combina, M. 2007. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. Food Microbiol. 24, 403-412.

Milanovic V., Ciani, M., Oro, L., Comitini, F. 2012. *Starmerella bombicola* influences the metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* at piruvate descarboxylase and alcohol dehydrogenase level during mixed wine fermentation. Microbial Cell Factories 11:18.

Moreira, N, Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., Vasconcelos, I. 2008. Heavy sulphur compounds: higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. International Journal of Food Microbiology 124, 231-238.

Moreira, N, Pina, C., Mendes, F., Couto, J.A., Vasconcelos, I. 2011. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. Food Control 22, 662-667.

Mortimer, R., Polsinelli, M. 1999. On the origins of wine yeast. Res. Microbiol., 150: 199-204.

Nisiotou, A.A., Spiropoulos, A.E., Nychas, G.J.E. 2007.Yeasts community structures and dynamics in healthy and *Botrytis*-affected grape must fermentations. Applied and Environmental Microbiology 73, 6705-6713.

Nissen, P., Nielsen, D., Arneborg, N. 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell contact-mediated mechanism. Yeast 20, 331-341.

Palomero, F., Morata, A., Benito, S., Calderón, F., Suárez-Lepe, J.A. 2009. New genera of yeasts for over-lees aging of red wine. Food Chemistry 112, 432-441.

Parle, J. N.; di Menna, M. E. 1966. The source of yeasts in New Zealand wines. New Zealand Journal of Agricultural Research 9: 98-107.

Peynaud, E. 1989. Enología práctica. Conocimiento y elaboración del vino. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, pp. 122.

Pérez-Nevado, F., Albergaria, H., Hogg, T., Girio, F. 2006. Cellular death of two non-*Sccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology 108, 336-345.

Pina, C., Santos, C., Couto, J.A., Hogg, T. 2004. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* – influence of different culture conditions. Food Microbiology, 21: 439-447.

Pretorius, I. 2000. Yeast, 16: 675-729. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking.

Pretorius, I.S., Van der Westhuizen, T.J., Augustyn, O.P.H. 1999. Yeast biodiversity in vineyeards and wineries and its importance to the South African wine industry. A review. S.Afr. J. Enol. Vitic., 20(2), 61-64.

Querol, A., Barrio, E., Ramón, D. 1994. Population dynamics of wine yeast strains in natural fermentations. Int. J. Food Microbiol., 21, 315-323.

Renault, P., Miot-Sertier, C., Marullo, P., Hernández-Orte, P., Lagarrigue, L., Lonvaud-Funel, A., Bely, M., 2009. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. International Journal of Food Microbiology 134, 201-210.

Renouf, V., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A. 2007a. Yeast and bacteria analysis of grape, wine and cellar equipments by PCR-DGGE. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin 41, 1, 51-61.

Renouf, V., Perelló, MC., Revell, G., Lonvaud-Funel, A. 2007b. Survival of wine microorganisms in the bottle during storage. American Journal of Enology and Viticulture 58, 3, 379-386.

Renouf, V., Perello, M.C., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A. 2006. Évolution de l'écosystem pendant la vinification. J. Int. Sci. Vigne Vin, 40(2), 101-116.

Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. 2005. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. Aust. J. Grape Wine Res., 11, 316-327.

Ribèrèau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. 1998. Traité d´Oenologie.2. Chimie du vin. Stabilisation et traitements. Ed. Dunod, París, pp.519.

Rodrígues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. 2001. Development and use of a differential medium to detect yeast of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. Journal of applied Microbiology 90, 588-599.

Romano, P., Fiore, C., Caruso, M., Capece, A. 2003a. Function of yeast species and strains in wine flavour. International Journal of Food Microbiology 86, 169-180.

Romano, P., Granchi, L., Caruso, M., Borra, G., Palla, G., Fiore, C., Ganucci, D., Caligiani, A., Brandolini, V. 2003b. The species-specific ratios of 2,3-butanediol and acetoin isomers as a tool to evaluate wine yeast performance. International Journal of Food Microbiology 86, 163-168.

Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., Guillamón, J. M. 2002.Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA Microbiol. Res. 157, 267–274.

Salustiano, V.C., Andrade, N.J., Cardoso, S.C., Cordeiro, R.M., Kitakawa, S.A. 2003. Microbiological air quality of processing areas in a dairy plant as evaluated by sedimentation technique and a one-stage air sampler. Brazilian Journal of Microbiology, 34, 255–259.

Santamaría, P., López E., López, R., Garijo, P., Gutiérrez, A.R. 2008. Permanence of yeast inocula in the winery ecosystem and presence in spontaneous fermentations. European Food Research and Technology, 227: 1563-1567.

Schuller, D., Alves, H., Dequin, S., Casal, M. 2005. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. FEMS Microbiol. Ecol. 51, 167-177.

Seo, S.H., Rhee, C.H., Park, H.D. 2007. Degradation of malic acid by *Issatchenkia orientalis* KMBL 5774, an acidophilic yeast strain isolated from Korean grape wine pomace. Journal of Microbiology 45, 521-527.

Soden, A., Francis, I.L., Oakey, H., Henschke, P.A. 2000. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. Australian Journal of Grape and Wine Research 6, 21-30.

Spagna, G., Barbagallo, R.N., Palmeri, R., Restuccia, C., Giudici, P. 2002. Properties of endogenous β-glucosidase of a *Pichia anomala* strain isolated from Sicilian musts and wines. Enzyme and Microbial Technology, 31, 1036-1041.

Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., van Rensburg, P. 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. Journal of Applied Microbiology 91, 182-190.

Suárez, R., Suárez-Lepe, J.A., Morata, A., Calderón, F. 2007. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*. A Review. Food Chemistry 102, 1021.

Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. Australian Journal of Grape and Wine Research, 11(2), 139-173.

Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A. 2001. Yeast population dynamics in spontaneus fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. Antonie van Leeuwenhoek, 79, 345-352.

Trioli, G. 2009. Contaminación microbiana en el vino. P.4. www.infowine.com. Revista internet de viticultura y enología, 2009, nº 10/1.

van der Westhuizen, T.J., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S. 2000. Geographical distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from vineyards in the coastal regions of the Western Cape in South Africa. S. Afr. J. Enol. Vitic., Vol. 21, Nº 1: 3-9.

Vaughan-Martini, A. y Martini, A. 1995. Facts, myths and legends on the prime industrial microorganisms. J. Indust. Microbiol., 14, 514-522.

Viana, F., Gil, J.V., Genovés, S., Vallés, S., Manzanares, P. 2008. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. Food Microbiology 25, 778-785.

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* straits under wine-model conditions. FEMS Yeast Research, 8, 1087-1096.

Wang, C., Liu, Y. 2013. Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang, China. Food Microbiology 33, 172-177.

Wedral, D., Shewfelt, R., frank, J. 2010. The challenge of *Brettanomyces* in wine. LWT- Food Science and Technology 43, 1474-1479.

Xufre, A., Albergaria, H., Inacio, J., Spencer-Martins, I., Girio, F. 2006. Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to the analysis of yeasts populations dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. International Journal of Food Microbiology 108, 376-384.

Zacchi, L., Vaughan-Martini, A. 2002. Yeasts associated with insects in agricultural areas of Perugia, Italy. Ann. Microbiol., 52, 237-244.

Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D., 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.

Zott, K., Thibon, C., Bely, M., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D., Masneuf-Pomarede, I. 2011. The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: impact on volatile thiol release. International Journal of Food Microbiology 151, 210-215.

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue hacer una aproximación a la ecología de las levaduras no-*Saccharomyces* en el contexto de la D.O.Ca. Rioja. En esta región son prácticamente inexistentes los trabajos realizados acerca de las levaduras no-*Saccharomyces* presentes en los ecosistemas de las bodegas y de las uvas y las que participan en las fermentaciones alcohólicas.

Es interesante conocer las especies que se pueden encontrar tanto en la uva, que es origen de levaduras para la fermentación alcohólica, como en los equipamientos y las superficies de las bodegas y en el aire de las mismas, pues son otros posibles medios de transmisión de levaduras enológicas. Las superficies y el material de la bodega son, como muchos estudios ya han demostrado, un reservorio de levaduras a lo largo de todo el año, mientras no hay apenas actividad en la bodega. El aire, sin ser un reservorio en sí, es un medio de dispersión de levaduras dentro de esas bodegas desde las zonas de mayor actividad fermentativa, en el caso de levaduras con poder fermentativo, o desde zonas con cualquier tipo de actividad y en las que pueden desarrollarse levaduras de otro tipo, no fermentadoras, o incluso con capacidad de alterar los vinos.

El conocimiento de las levaduras no-*Saccharomyces* con carácter fermentativo propias de esta Denominación es necesario como paso previo al desarrollo de cultivos mixtos adaptados a las características de las uvas y los mostos, en la estela de las cepas de *S. cerevisiae* seleccionadas y comercializadas previamente en esta región.

Del mismo modo es importante determinar la presencia y las formas de diseminación de aquellas levaduras que supongan un riesgo para la calidad del vino por su carácter alterante del mismo, como puede ser el género *Brettanomyces*. Con ello, podrán plantearse métodos de control y/o eliminación de estos microorganismos en las bodegas.

Los objetivos concretos que se plantearon en esta tesis fueron:

I. Conocer la diversidad de levaduras en uvas de la D.O.Ca. Rioja y la importancia cuantitativa de cada especie en la población total.

II. Estudiar la diversidad de levaduras en fermentaciones alcohólicas espontáneas de la región y la importancia cuantitativa de cada especie a lo largo del proceso fermentativo.

III. Determinar la diversidad de levaduras en las superficies y el material de bodega en la D.O.Ca. Rioja.

IV. Estudiar la composición de la población de levaduras del aire en bodegas de la D.O.Ca. Rioja.

V. Evaluar la capacidad de distintos medios de cultivo para la recuperación de distintas especies de levaduras presentes en el aire de las bodegas.

3. Metodología

3.1. Presentación de los ensayos

Para alcanzar los objetivos planteados en este trabajo de tesis se realizaron un total de siete ensayos: dos en uvas, dos en fermentación alcohólica, uno en superficies y en mosto en contacto con las mismas y dos en aire de bodegas.

Estos ensayos y sus resultados se recogen en seis trabajos, publicados en forma de artículo científico, a excepción del primero, que formó parte de la memoria presentada para la obtención de la Suficiencia Investigadora. Todos se presentan en el apartado *4. Resultados*, y son los siguientes:

Primer y segundo ensayos. Estudio de las levaduras no-*Saccharomyces* presentes en uvas de la D.O.Ca. Rioja. Este trabajo formó parte de la Memoria de Investigación presentada por la autora para obtener la Suficiencia Investigadora en 2005, titulado *"Estudio de las levaduras no-*Saccharomyces *que participan en la elaboración de vinos de la D.O.Ca. Rioja".*

Tercer y cuarto ensayos. Estudio de las levaduras presentes en fermentaciones alcohólicas espontáneas en la D.O.Ca. Rioja. Este trabajo formó parte del mencionado Trabajo de Investigación presentado por la autora para obtener la Suficiencia Investigadora en 2005. Los resultados se recogen asimismo en la publicación *"Quantitative and qualitative analysis of non-*Saccharomyces *yeasts in spontaneous alcoholic fermentations".* E. Ocón, A.R. Gutiérrez, P. Garijo, C. Tenorio, I. López, R. López, P. Santamaría. European Food Research and Technology (2010) 230: 885-891.

Quinto ensayo. Estudio de las levaduras presentes en el equipamiento de bodegas de la D.O.Ca. Rioja y en el mosto durante la vendimia. Los resultados se recogen en la publicación *"Presence of non-*Saccharomyces *yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time".* E. Ocón, A.R. Gutiérrez, P. Garijo, R. López, P. Santamaría. Food Microbiology (2010) 27: 1023-1027.

Sexto ensayo. Estudio de las levaduras presentes en el aire de una bodega a lo largo de un año. Los resultados se recogen en la publicación *"Analysis of airborne yeast in*

one winery over a period of one year". E. Ocón, P. Garijo, S. Sanz, C. Olarte, R. López, P. Santamaría, A.R. Gutiérrez. Food Control (2013) 30: 585-589.

Séptimo ensayo. Estudio de las levaduras presentes en el aire de las bodegas y del riesgo de contaminación de los vinos. Comparación de medios de cultivo para la recuperación de levaduras presentes en el aire en bodegas. Los resultados se recogen en las publicaciones *"Screening of yeast mycoflora in winery air samples and their risk of wine contamination".* E. Ocón, P. Garijo, S. Sanz, C. Olarte, R. López, P. Santamaría, A.R. Gutiérrez. Food Control (2013) 34: 261-267; *"Comparison of culture media for the recovery of airborne yeast in wineries".* E. Ocón, P. Garijo, P. Santamaría, R. López, C. Olarte, A.R. Gutiérrez, S. Sanz. Letters in Applied Microbiology (2013) 57, 241-248.

3.2. Plan de trabajo

A continuación se recoge una breve introducción del plan de trabajo seguido en cada uno de los ensayos. En el apartado *3.3.* se describe en detalle la metodología utilizada.

3.2.1. Ensayos en uvas. Estudio de las levaduras no-*Saccharomyces* presentes en uvas de la D.O.Ca. Rioja

Los ensayos realizados en uvas se realizaron en dos años consecutivos para estudiar las levaduras presentes en la superficie de las bayas.

En el primero de ellos, se tomaron muestras de uva de la variedad Tempranillo, procedentes de tres subzonas de la D. O. Ca. Rioja: Rioja Alta, Rioja Media y Rioja Baja, durante el periodo de maduración. El objetivo era la cuantificación de las poblaciones de levaduras y la determinación de la diversidad cualitativa de especies presentes en las uvas, sin atender a la frecuencia de aparición de cada una de ellas.

El segundo de los ensayos se realizó el año siguiente con uva procedente de la misma parcela de Rioja Baja estudiada el año anterior. Se tomaron muestras a lo largo del periodo de maduración para estudiar el tamaño de las poblaciones de levaduras y la frecuencia de aparición de cada especie en las uvas. Todas las muestras recogidas en los dos ensayos fueron

incubadas en medio de cultivo adecuado para realizar el posterior recuento e identificación de levaduras.

3.2.2. Ensayos en fermentación alcohólica. Estudio de las levaduras presentes en fermentaciones alcohólicas espontáneas en la D.O.Ca. Rioja

En los dos ensayos realizados se pretendía estudiar la micobiota presente en las fermentaciones alcohólicas realizadas a partir de las uvas de los mismos viñedos del trabajo anterior. En el primero se pretendía determinar la diversidad de levaduras presentes en la fermentación alcohólica de forma cualitativa, sin tener en cuenta la frecuencia de aparición de cada especie. En el segundo ensayo, realizado al año siguiente, se quiso conocer la importancia cuantitativa de cada especie, por lo que se estudió la frecuencia de aparición de cada una de ellas en la vinificación.

En el primer ensayo, se realizaron tres vinificaciones, cada una con uvas de una zona, Rioja Baja, Rioja Media y Rioja Alta. En el segundo ensayo se realizó una fermentación con uvas de la zona de Rioja Baja. Todas las fermentaciones fueron espontáneas, sin inoculación de Levaduras Secas Activas, y se llevaron a cabo en la bodega experimental del CIDA en depósitos de 220 litros. Durante este proceso se tomaron muestras de mosto-vino desde el encubado hasta el fin de la fermentación. Las muestras fueron incubadas en medio de cultivo adecuado para el recuento e identificación de levaduras.

3.2.3. Ensayo en superficies y en mosto en contacto con las mismas. Estudio de las levaduras presentes en el equipamiento de la bodega y en el mosto durante la vendimia

Este ensayo se realizó durante la vendimia, en la segunda quincena del mes de septiembre del año 2006. Se estudió la micobiota presente en el equipamiento de cuatro bodegas de la D.O.Ca. Rioja, una en cada subzona de la Denominación: Bodega de Rioja Baja (1), Bodega de Rioja Media (2), Bodega de Rioja Alta (3) y Bodega de Rioja Alavesa (4). Se tomaron muestras de diez puntos del equipamiento y las superficies de cada bodega un día

antes de la entrada de uva, tras la limpieza realizada de todo el equipamiento para el comienzo de las vinificaciones.

Para analizar la posible aportación del equipamiento de la bodega a los mostos, se tomó también una muestra en cada una de las bodegas del primer mosto encubado en depósitos con 200 kg de uva y sin adición de Levaduras Secas Activas. Todas las muestras recogidas se incubaron en un medio de cultivo adecuado para el posterior recuento e identificación de levaduras.

3.2.4. Ensayos en aire. Estudio de las levaduras presentes en el aire de una bodega a lo largo de un año

Se realizaron dos ensayos para estudiar las especies de levaduras que pueden detectarse en el aire de diferentes zonas de las bodegas, y evaluar qué medios de cultivo son los más adecuados para la recuperación de esas poblaciones.

El primer ensayo se llevó a cabo en una bodega de la D.O.Ca. Rioja desde febrero de 2008 hasta enero de 2009. La bodega tiene una distribución en dos plantas: en la inferior, bajo el nivel del suelo, se encuentran las zonas de crianza en barrica y de crianza en botella, comunicadas entre sí; en la superior, y a nivel del suelo, se encuentran las naves de elaboración y la de embotellado, muy próximas la una a la otra. En esta bodega se llevaron a cabo muestreos de aire mensuales en cada una de esas cuatro zonas, en tres medios de cultivo diferentes para estimar las poblaciones de levaduras en general y, además, de la especie *B. bruxellensis*.

El segundo ensayo en el que se estudió el aire se llevó a cabo en tres bodegas pertenecientes a la D.O.Ca.Rioja, desde febrero de 2009 hasta enero de 2010. Fueron seleccionadas en función de su antigüedad, tamaño y distribución de los espacios.

La Bodega 1 tenía una antigüedad de 10 años, una producción anual de 500000 l de vino y todas las zonas de la bodega estaban comunicadas entre sí.

La Bodega 2 tenía 30 años de antigüedad, producía 3000000 l de vino al año y cada zona de trabajo estaba situada en un edificio independiente.

La Bodega 3 tenía una antigüedad de 40 años, una producción anual de 7000000 l de vino y una distribución en dos plantas, una de ellas bajo el nivel del suelo. Era la misma bodega en la que se realizó el ensayo anterior.

Se tomaron muestras de aire en las zonas de embotellado, elaboración, crianza en barrica y crianza en botella cuatro veces a lo largo de un año. Los muestreos se realizaron en los tres medios de cultivo utilizados en el ensayo anterior para estimar las poblaciones de levaduras en general y de la especie *B. bruxellensis*. De esta manera, se completó el estudio de las levaduras del aire en bodegas con distinta antigüedad y diseño.

Todas las muestras recogidas fueron incubadas para realizar el recuento de colonias y la identificación de levaduras.

Con los resultados de estos dos ensayos se estudió también la utilidad de los distintos medios de cultivo utilizados, que fueron Cloranfenicol Glucosa Agar (CGA), Agar Lisina (AL) y *Dekkera/Brettanomyces* Diferential Medium (DBDM) junto con un Medio de Revitalización (MR), en la recuperación de levaduras procedentes del aire de las bodegas. Para ello se compararon los resultados obtenidos en el primer ensayo del aire en una de las bodegas con los recogidos en las tres bodegas del segundo ensayo, teniendo en consideración los recuentos poblacionales y los géneros y especies encontrados en unos y otros medios de cultivo.

3.3. Descripción de la metodología

3.3.1. Toma y procesamiento de las muestras

Todas las muestras de los ensayos se tomaron por duplicado.

3.3.1.1. Muestreos de uvas

En el primer ensayo se tomaron muestras de uvas de las zonas de Rioja Baja, Media y Alta en dos momentos: siete días antes de la fecha de vendimia y un día antes de la fecha de vendimia.

En el segundo ensayo, realizado al año siguiente, se tomaron muestras de la zona de Rioja Baja en tres momentos a lo largo del período de maduración: doce días, nueve días y un día antes de la fecha de vendimia.

En cada muestreo se tomaron en un recipiente estéril 100 bayas al azar de cada parcela y se trasladaron al laboratorio. El procesamiento de la muestra se realizó siguiendo el método de Zahavi et al. (2002). Se tomaron 10 bayas al azar de entre las 100 recogidas, se introdujeron en un vaso de vidrio estéril y se sumergieron en un volumen de agua destilada estéril suficiente para cubrirlas. El vaso se mantuvo durante una hora en un agitador orbital a 150 rpm para desprender la micobiota epifítica de las uvas y que pasara al agua de lavado. Ésta se utilizó como inóculo directo o con dilución decimal y se inocularon en superficie 50 µl de cada muestra en placas Petri con Agar Malta suplementado con penicilina, utilizada como inhibidor de bacterias lácticas.

Estas placas se incubaron de tres a cinco días en estufa a 28ºC, tras añadir unos cristales de difenilo para inhibir el crecimiento de mohos.

3.3.1.2. Muestreos durante las fermentaciones alcohólicas

En el tercer y cuarto ensayos de esta tesis, llevados a cabo en años consecutivos, se estudiaron las levaduras presentes en las fermentaciones alcohólicas de tres zonas de la Denominación. En el primer año, se muestrearon tres depósitos, uno con uvas de Rioja Alta, otro con uvas de Rioja Media y otro con uvas de Rioja Baja, y ese muestreo se llevó a cabo a las 0, 6, 18, 24, 30, 42, 48, 120 y 216 horas a partir del encubado.

En el segundo año, el muestreo se realizó en el depósito con uvas procedentes de la parcela de Rioja Baja y se llevó a cabo a las 0, 8, 20, 32, 44, 56, 72, 96, 120 y 216 horas a partir del encubado.

El mosto-vino recogido en cada muestreo se introdujo en un recipiente estéril para su traslado al laboratorio. Se utilizó el método de las diluciones decimales y se inocularon en superficie 50 µl de la muestra en placas Petri con Agar Malta suplementado con penicilina. Estas placas se incubaron de tres a cinco días en estufa a 28ºC.

3.3.1.3. Muestreos de instalaciones

En el estudio de las levaduras en el equipamiento de las bodegas y de los mostos se llevaron a cabo muestreos de las distintas zonas de las instalaciones de cuatro bodegas de la D.O.Ca. Rioja. Se tomaron muestras de diez puntos diferentes: tolva de recepción, despalilladora, estrujadora, bomba de pastas, pared del depósito, boca del depósito, prensa neumática, bomba de trasiego, suelo de la bodega y pared de la bodega.

El muestreo se realizó con placas Rodac, especialmente preparadas para la toma de muestras por contacto, con medio de cultivo CGA, aplicadas directamente sobre la superficie a muestrear durante 30 segundos. Las placas fueron incubadas a 25ºC durante 48 horas.

3.3.1.4. Muestreos de mostos

En el estudio de las levaduras en el equipamiento de las bodegas y de los mostos se llevó a cabo un muestreo del primer mosto encubado en las cuatro bodegas estudiadas. La muestra se recogió en todos los casos a las 24 horas del encubado.

El volumen de mosto recogido se introdujo en un recipiente estéril para su traslado al laboratorio y una vez allí se utilizó el método de las diluciones decimales y se inocularon en superficie 50 µl de la muestra en placas Petri con CGA. Estas placas se incubaron durante 48 horas a 25ºC.

3.3.1.5. Muestreos de aire

En los dos últimos ensayos de esta tesis se analizó la presencia y la recuperación de levaduras del aire de varias bodegas.

En el estudio del aire de una bodega los muestreos se realizaron una vez al mes en las zonas de crianza en barricas, crianza en botella, elaboración y embotelladora.

En el estudio de las levaduras en el aire de tres bodegas los muestreos se realizaron en cuatro momentos a lo largo de un año: invierno, primavera, verano y otoño, y, de nuevo, en

las mismas zonas de las bodegas. Los muestreos de otoño coincidieron con la época en la que estaban teniendo lugar las elaboraciones en todas las bodegas.

Todos los muestreos se llevaron a cabo con el muestreador de aire airIDEAL 3P, de la casa comercial Biomèrieux (Fig. 1), que permite la toma de diferentes volúmenes de aire de forma directa en placas Petri, para detectar la presencia de microorganismos. El aire es aspirado a una velocidad de impacto inferior a 20 m/s por una turbina que atraviesa una rejilla estéril, la cual captura partículas de tamaño de 3 µm. El volumen de aire aspirado impacta sobre una placa Petri de 100 mm de diámetro que contiene un medio de cultivo adecuado. Se utilizaron placas con medio CGA, placas con AL, ambos para recoger levaduras en general y placas con MR, medio de revitalización con un filtro de papel de 0.45 µm de diámetro de poro sobre el medio para, tras un breve periodo de incubación, transferirlo al medio DBDM, específico para la detección del género *Brettanomyces/Dekkera*. El medio MR fue utilizado para estimular el crecimiento de levaduras en situación de estrés antes de transferirlas a un medio muy restrictivo como es el DBDM.

Figura 1.- Muestreador de aire airIDEAL 3P, utilizado en los ensayos.

La toma de muestras se realizó en todos los casos de la misma manera, con el muestreador situado a una distancia de 1-1.5 m del suelo, en una zona central de cada una de las naves, a excepción de la zona de embotellado, donde el muestreador se colocó dentro de la línea de la embotelladora, lo más próximo posible a la llenadora. Los muestreos se realizaban

siempre en un único día para cada bodega, entre las 8:00 y las 12:00 horas, y siempre en la misma semana.

Los volúmenes de aire recogidos en todos los casos fueron 500 l cuando los medios de cultivo eran CGA y AL, y 1500 l cuando el medio utilizado era MR. Las muestras recogidas en CGA y AL fueron incubadas a 25ºC durante 72 horas. Las muestras recogidas en MR fueron incubadas a 25ºC durante 24 horas, tras lo cual el filtro de papel con las colonias recogidas fue transferido a otra placa con medio DBDM, que se incubó a 25ºC durante 21 días.

3.3.2. Recuentos y selección de colonias

Tras los periodos de incubación correspondientes en cada ensayo, se llevaron a cabo los recuentos poblacionales en cada placa, tomando como dato la media de las dos repeticiones, y la selección de colonias para su identificación.

3.3.2.1. Recuento y selección en uva

En este caso, los recuentos se expresaron como Unidades Formadoras de Colonias por baya (UFC/baya). En el primero de los ensayos se eligieron 10 colonias de cada muestra en función de su morfología (color, brillo, forma, tamaño) para su identificación. En el segundo ensayo, se eligieron 25 colonias al azar.

3.3.2.2. Recuento y selección en fermentaciones alcohólicas

Los recuentos se expresaron como UFC/ml. En el primer ensayo de las fermentaciones alcohólicas espontáneas se eligieron 10 colonias de cada muestra en función de su morfología (color, brillo, forma, tamaño) para su identificación. En el segundo ensayo, se eligieron 25 colonias al azar.

3.3.2.3. Recuento y selección en superficies

Tras los recuentos de levaduras en las placas Rodac, de cada una de las muestras se seleccionaron cinco colonias al azar para su identificación.

3.3.2.4. Recuento y selección en mosto

En el estudio de las superficies y los mostos en contacto con las mismas, tras los recuentos de levaduras, se seleccionaron 10 colonias al azar para su identificación.

3.3.2.5. Recuento y selección en aire

El resultado obtenido en los recuentos se expresó como el número más probable de microorganismos recogidos por placa (NMP). Para realizar la conversión del número de unidades formadoras de colonias en el número más probable, se utilizó una tabla estadística de conversión que se basa en la Ley de Feller:

$$NMP = N\ (1/N + 1/N-1 + 1/N-2 + ... + 1/N-UFC+1)$$

Donde:

NMP=cantidad total más probable de microorganismos que hayan atravesado los orificios de la placa.

N=cantidad de orificios de la rejilla

UFC=unidades formadoras de colonias, valor leído en el laboratorio.

Con el fin de determinar el número más probable de microorganismos recogidos por metro cúbico de aire (NMP/m^3), el número más probable de microorganismos recogidos por placa se multiplicó por 1000 y se dividió por el volumen de aire del muestreo en litros.

En los tres trabajos, se seleccionaron como máximo 10 colonias al azar por cada muestra para su posterior identificación.

3.3.3. Aislamiento y conservación de colonias

Todas las colonias seleccionadas, independientemente de su origen, fueron reaisladas por agotamiento de la estría en placa Petri con medio Levadura-Malta (LM) para asegurar la presencia de colonias de un solo tipo de microorganismo (cultivo puro). Estos aislamientos se incubaron durante 24-48 horas a 28 ºC para obtener cultivo fresco para su conservación en tubos *eppendorf* con glicerol al 20% a -20ºC.

3.3.4. Identificación de las colonias aisladas

3.3.4.1. Extracción del ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de un cultivo fresco empleando el método propuesto por López (2004). A partir de un cultivo puro en placa de 48 h se recogió parte del mismo y se resuspendió en 250 µl de tampón de lisis en un tubo *eppendorf*. Se sometió a 100ºC durante 10 min en un baño de agua. Se homogeneizó y se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min. El sobrenadante, con el ADN celular, se recogió en un *eppendorf* estéril para su utilización en los diferentes métodos de identificación utilizados.

3.3.4.2. Identificación de las especies de levaduras mediante PCR-RFLP

Todas las colonias seleccionadas en todos los ensayos fueron sometidas a la técnica PCR-RFLP de la región ITS del ADN ribosómico, según el método propuesto por Esteve-Zarzoso et al. (1999). Esta técnica es una de las más comúnmente utilizadas para la identificación de especies de levaduras en Enología, pues es un método rápido, eficaz y reproducible (Fernández et al., 1999; Pulvirenti y Giudicci, 2003). La zona amplificada del ADN codifica la región conocida como ITS (Internal Transcribed Spacer) ó 5.8S-ITS del ARN ribosómico. Los cebadores empleados para la reacción de PCR en esta región, descritos

por White et al. (1990), son los mismos para más de 500 especies de levaduras, por lo que las diferencias se establecen por el diferente tamaño del amplificado y por el perfil de restricción obtenido para cada especie al someter a ese fragmento a la acción de tres enzimas de restricción, en este caso, *Hinf*I, *Hae*III y *Cfo*I.

A) Reacción en cadena de la polimerasa

La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 50 µl, utilizando los componentes que se indican a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1.-. Componentes de la reacción de PCR, volumen y concentración.

Componentes	Volumen muestra	Concentración final en la reacción
Tampón de reacción NH_4^+ (Bioline)	5 µl	**1x**
$MgCl_2$ 50 mM (Bioline)	3 µl	**3 mM**
4 dNTP mix 50 mM (Bioline)	1 µl	**12.5 mM**
Cebador directo 25 pmol/µl (TIB Molbiol)	1 µl	**0.5 pmol/ µl**
Cebador reverso 25 pmol/µl (TIB Molbiol)	1 µl	**0.5 pmol/ µl**
Biotaq™ DNA polimerasa (Bioline)	0.3 µl	**1.5 U**
H_2O destilada estéril	28.7 µl	**-**
ADN	10 µl	**-**

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp® PCRSystem 2700 (Applied Biosystems). Las secuencias de los cebadores y las condiciones de amplificación se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2.- Cebadores y condiciones de amplificación de la PCR de levaduras (Esteve-Zarzoso et al., 1999).

Cebadores (secuencia 5´ → 3´)	Fragmento amplificado (pb)	Condiciones de amplificación		
		95ºC	**5 min**	**1 ciclo**
ITS1 TCCGTAGGTGAACCTGCGG **ITS4** TCCTCCGCTTATTGATATGC	Variable según género de levadura	**94ºC** **55.5ºC** **72ºC**	**1 min** **2 min** **2 min**	**35 ciclos**
		72ºC	**10 min**	**1 ciclo**

B) Restricción de los productos de PCR

El producto de PCR obtenido de cada muestra en el apartado anterior fue sometido directamente a restricción con tres enzimas diferentes: *Hinf* I, *Hae*III y *Cfo*I, según se indica en la Tabla 3.

Tabla 3.- Componentes del análisis de restricción.

Componentes	Volumen por reacción Volumen final 10 µl
Enzima de restricción *Hinf*I, *Hae*III o *CfoI*	**0.5 µl**
SuRE/Cut buffer H, M ó L	**1 µl**
Agua destilada estéril	**3.5 µl**
Producto de PCR	**5 µl**

Este volumen se incubó en baño termostático de agua a 37ºC durante 90 min para que se produjera la reacción enzimática.

C) Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de los productos de amplificación de PCR y de los fragmentos de restricción de cada uno de ellos, se utilizó la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa.

En el caso de los productos de PCR se utilizó un gel al 1.5% (p/v) de agarosa en tampón TBE 0.5x, y en el de los fragmentos de restricción un gel al 3% de agarosa en tampón TBE 0.5x. Las dimensiones de los geles fueron de 15x15 cm^2 y la electroforesis se llevó a cabo en la unidad BIO-RAD SUB-CELL GT a 150 V durante 1 h 45 min para el producto de PCR y 2 h 45 min para los fragmentos de la digestión.

Finalizadas las electroforesis los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio de 0.5 µg/ml y fueron visualizados, analizados y fotografiados en el equipo Image Store 5000 (UVP) (BIO-RAD) con el programa *Quantity One*.

D) Identificación de especies de levaduras

El peso molecular del fragmento de ADN ribosómico amplificado se estimó por comparación con el marcador de peso molecular HyperLadder IV de Bioline de 100-1000 pb y se comparó con los perfiles descritos en bibliografía (Guillamón et al., 1998; Granchi et al., 1999) (Fig. 2).

Los productos de amplificación de distinto tamaño corresponden a especies diferentes; sin embargo cuando los amplificados son del mismo tamaño no siempre corresponden a la misma especie, por lo que es necesario recurrir a los perfiles de restricción de estos amplificados con diferentes enzimas. Igualmente, los pesos moleculares de los fragmentos obtenidos con cada enzima se determinaron por comparación con el marcador de peso molecular y se confrontaron con los aportados en bibliografía y con los identificados a través del portal *www.yeast-id.org*. En la Fig. 3 se muestran tres perfiles de restricción correspondientes a las especies *A. pullulans*, *K. apiculata* y *S. cerevisiae.*

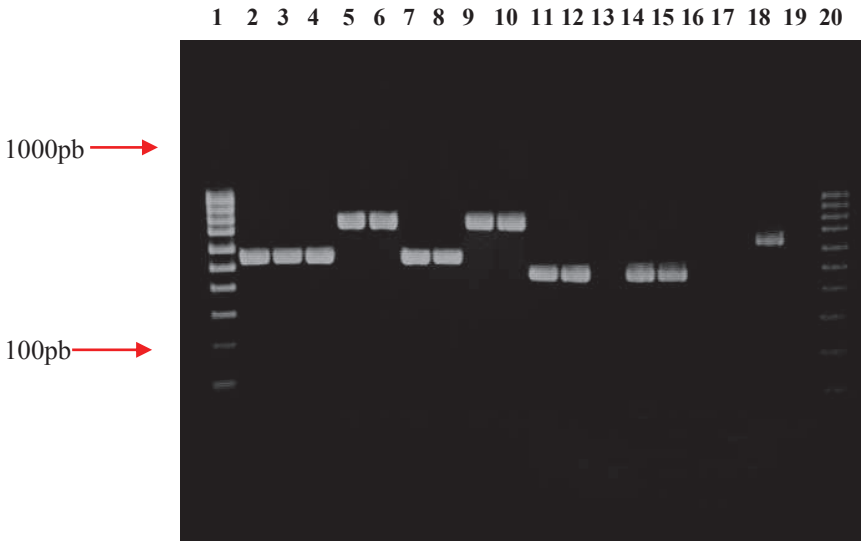

Figura 2.- Ejemplo de electroforesis en gel de agarosa de los amplificados de PCR de varias especies. Carriles 1 y 20: Marcador de 100pb (Hyperladder IV). Carriles 2, 3, 4, 7y 8: producto de PCR de 585pb. Carriles 5, 6, 9 y 10: producto de PCR de 800pb. Carriles 11, 12, 14 y 15: producto de PCR de 400pb.

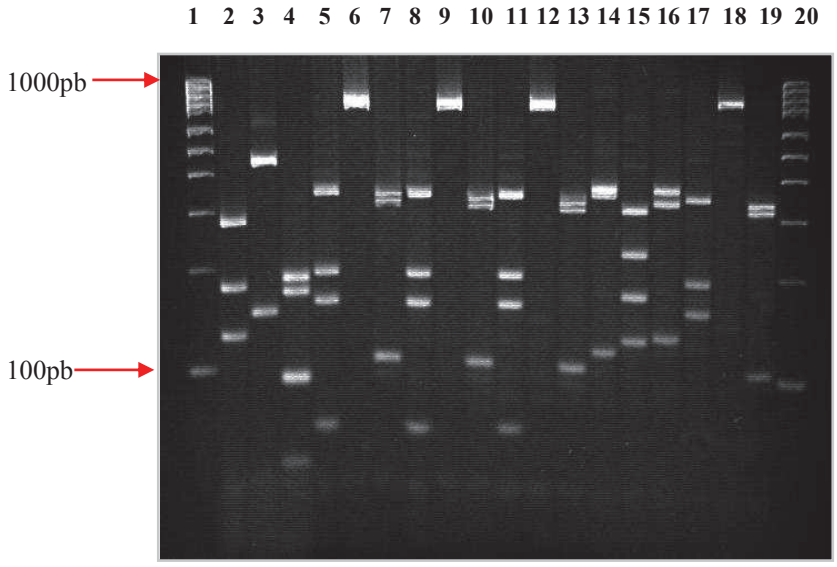

Figura 3-. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de restricción de varias especies. Carriles 1 y 20: corresponden al marcador de 100pb. Los carriles 2, 3 y 4 corresponden a los cortes con los enzimas *Hinf*I, *Hae*III y *Cfo*I que representan a la especie *A. pullulans*. Los carriles 5, 6 y 7; 8, 9 y 10; 11, 12 y 13 y 17, 18 y 19 son cortes realizados con los mismos enzimas y corresponden a la especie *K. apiculata*. Los carriles 14, 15 y 16 son los obtenidos con los tres enzimas y representan el perfil de *S. cerevisiae*.

3.3.4.3. Identificación de las especies de levaduras mediante secuenciación del ADN

Las colonias cuyos perfiles no fue posible identificar por el método anterior, se identificaron mediante secuenciación. Para ello, se amplificó mediante PCR el dominio D1/D2 con los cebadores y condiciones descritos por Kurtzman y Fell (1998) y que se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4.- Cebadores y condiciones de la PCR universal de levaduras (Kurtzman y Fell., 1998).

Cebadores (secuencia 5´ → 3´)	Fragmento amplificado (pb)	Condiciones de amplificación		
		94ºC	3 min	1 ciclo
NL1				
GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	580	94ºC	1 min	
NL4		52ºC	45 s	36 ciclos
GGTCCGTGTTTCAAGACGG		72ºC	2 min	
		72ºC	4 min	1 ciclo

Esta técnica se basa en el análisis de una pequeña parte de la subunidad 26S del ADN ribosómico, el dominio D1/D2, un fragmento constituido por 600 pb. La región D1/D2 puede considerarse como la "huella digital" para un gran número de especies de Ascomicetos. La mayoría puede ser identificada en base a las diferencias existentes en este dominio (Kurtzman et al., 1998).

Los productos de PCR se purificaron y se secuenciaron por Macrogen Inc. Facilities (Seúl, Corea del Sur), para determinar el género y especie de levadura. Las secuencias resultantes se enfrentaron a la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.org) para determinar la especie a la que pertenecía cada colonia aislada.

3.3.4.4. Identificación de la especie *Brettanomyces bruxellensis* mediante PCR anidada

Las colonias recogidas en el medio de cultivo específico para *B. bruxellensis* (DBDM) fueron sometidas, después de obtener su perfil de restricción con la técnica de PCR-RFLP, a la técnica de PCR anidada (nested PCR), para confirmar su identificación. Se utilizó el método propuesto por Ibeas et al., (1996), para la identificación de la especie *B. bruxellensis* con esta técnica.

La PCR anidada, conocida como *nested PCR,* es una variante de la PCR convencional que comprende dos reacciones de amplificación con distintos pares de cebadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección.

En primer lugar se lleva a cabo una reacción con los cebadores que amplificarán una región más extensa de ADN. Después, el producto de amplificación de esa primera reacción se utiliza como muestra para una segunda PCR con los cebadores que se ubican dentro de ese primer fragmento amplificado, por lo que darán lugar a un producto menor dentro de ese fragmento.

La amplificación producida en las dos reacciones indica que el ADN analizado pertenece a la especie *B. bruxellensis*.

A) Reacción en cadena de la polimerasa

La mezcla de reacción para la primera PCR se preparó en un volumen final de 50 µl, utilizando los componentes que se indican a continuación en la Tabla 5.

Para la segunda reacción de PCR, en lugar de la muestra de 10 µl de ADN, se utilizó 1 µl del amplificado en la primera reacción.

Tabla 5.-. Componentes de la reacción de PCR, volumen y concentración.

Componentes	Volumen muestra	Concentración final en la reacción
Tampón de reacción NH_4^+ (Bioline)	5 µl	**1x**
$MgCl_2$ 50 mM (Bioline)	3 µl	**3 mM**
4 dNTP mix 50 mM (Bioline)	1 µl	**12.5 mM**
Cebador directo 25 pmol/µl (TIB Molbiol)	1 µl	**0.5 pmol/ µl**
Cebador reverso 25 pmol/µl (TIB Molbiol)	1 µl	**0.5 pmol/ µl**
Biotaq™ DNA polimerasa (Bioline)	0.3 µl	**1.5 U**
H_2O destilada estéril	28.7 µl	**-**
ADN	10 µl	**-**

Las secuencias de los cebadores, las condiciones de amplificación y los tamaños de los fragmentos de ADN amplificados fueron los de la Tabla 6 y Tabla 7.

Tabla 6.- Cebadores y condiciones de la primera PCR para identificar *B. bruxellensis* (Ibeas et al., 1998).

Primera PCR Cebadores (secuencia 5´ → 3´)	Fragmento amplificado (pb)	Condiciones de amplificación		
		95ºC	5 min	1 ciclo
DB1 AGAAGTTGAACGGCCGCATTTGCAC	471	95ºC	30 s	
		55ºC	30 s	30 ciclos
DB2 AGGATTGTTGACACTCTCGCGGAGG		72ºC	1 min	
		72ºC	10 min	1 ciclo

Tabla 7.- Cebadores y condiciones de la segunda PCR para identificar *B. bruxellensis* (Ibeas et al., 1998).

Segunda PCR **Cebadores (secuencia 5´ → 3´)**	**Fragmento amplificado (pb)**	**Condiciones de amplificación**		
		95ºC	5 min	1 ciclo
DB3 CGGCATATCGAAGACAG	327	95ºC	30 s	
		65ºC	30 s	30 ciclos
DB4 CATCCTCGCCATACAAC		72ºC	1 min	
		72ºC	10 min	1 ciclo

B) Electroforesis en gel de agarosa

La amplificación por PCR se comprobó de nuevo con la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% (p/v) de agarosa en tampón TBE 0.5x en la unidad BIO-RAD SUB-CELL GT a 150 V durante 1 h 45 min. Tras la tinción con solución de bromuro de etidio 0.5 µg/ml, los resultados se visualizaron en el equipo Image Store 5000 (UVP) (BIO-RAD) con el programa *Quantity One*.

3.3.5. Medios de cultivo y disoluciones

3.3.5.1. Medios de cultivo para aislamiento y crecimiento de levaduras

Agar de Malta + Penicilina Medio utilizado para el recuento y aislamiento de levaduras.

Extracto de malta	20 g
D-glucosa	20 g
Micopeptona	1 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Se esterilizó a 121ºC durante 20 minutos. Cuando descendió la temperatura por debajo de los 55ºC se añadieron 250 mg de Penicilina G (Sigma) para inhibir el crecimiento de bacterias lácticas.

Cloranfenicol Glucosa Agar (CGA) Medio utilizado para el recuento y aislamiento de levaduras.

Extracto de levadura	10 g
D (+) Glucosa	20 g
Cloranfenicol	0.5 g
Agar	17 g
Agua destilada	1000 ml

Se utilizó un medio deshidratado preparado (42.5 g/l, pH 6.6 +/- 0.2) y se esterilizó a 118ºC durante 15 min.

Agar Lisina (AL) Medio para recuento y aislamiento de levaduras.

Agar lisina	66 g
Lactato potásico al 50%	10 ml
Ácido láctico	1 ml
Agua destilada	1000 ml

Se disolvió el medio deshidratado Agar Lisina en 1 l de agua que contenía 10 ml de lactato potásico, y se llevó a ebullición hasta disolución completa. Se dejó enfriar a 50ºC y se añadió 1 ml de ácido láctico.

Medio Levadura-Malta (LM) Utilizado para el crecimiento de las colonias aisladas.

Extracto de levadura	3 g
Peptona	5 g
Glucosa	10 g
Extracto de malta	3 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Se esterilizó a 121ºC durante 20 minutos.

Medio de revitalización (MR) Utilizado como medio de revitalización previo al uso del medio DBDM.

TSB	30 g
Extracto de levadura	20 g
Agar	12 g
Agua destilada	1000 ml

Se esterilizó a 121ºC durante 20 minutos.

Medio *Dekkera/Brettanomyces* Diferential Medium (DBDM) Medio selectivo para la especie *B. bruxellensis*.

YNB (Yeast Nitrogen Base)	6.7 g
Agar	20 g
Agua destilada	940 ml

Se ajustó el pH a 5.4 añadiendo 30 ml de ácido sórbico al 0.15% y se esterilizó a 121ºC durante 20 minutos.

Por otra parte, se preparó la siguiente disolución:

Etanol	66 ml
Cicloheximida	10 mg
Acido p-cumárico	100 mg
Verde de bromocresol	22 mg
Cloranfenicol	200 mg

Se esterilizó por filtración (0.45 µm) y se mezclaron las dos soluciones cuando la temperatura del medio autoclavado estuvo entre 50-60ºC.

3.3.5.2. Disoluciones base

Tris HCl 1 M, pH = 8

Tris base (Sigma)	121.1 g
HCl 37% (Panreac)	42 ml
Agua destilada, csp	1000 ml

Se ajustó a pH = 8 con HCl y se enrasó. Se esterilizó a 121ºC durante 20 min.

EDTA 0.5 M, pH = 8

EDTA (Sigma)	186.1 g
Agua destilada, csp	1000 ml

Se ajustó a pH = 8 con NaOH y se enrasó. Se esterilizó a 121ºC durante 20 min.

Tampón TBE 5x

Tris base (Sigma)	54.0 g
Acido bórico (Sigma)	27.5 g
EDTA 0.5 M, pH = 8	20 ml
Agua destilada, csp	1000 ml

Se enrasó a 1 l. Se esterilizó a 121ºC durante 20 min.

Tampón de lisis para extracción de ADN

β-mercaptoetanol (2-mercaptoetanol) (Sigma)	700µl
Tris HCl 1 M, pH = 8	50 µl
Agua destilada, csp	100 ml

Se enrasó a 100 ml.

La extracción de ADN se realizó con una dilución 1:10 de este tampón.

Referencias bibliográficas

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. Bacteriology, 49: 329-337.

Fernández, M.T., Úbeda, J.F., Briones, A.I. 1999. Comparative study of non-*Saccharomyces* microflora of musts in fermentation, by physiological and molecular methods. FEMS Microbiology Letters, 173: 223-229.

Granchi, L., Bosco, M., Messini, A., Vincenzini, M. 1999. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. J. Appl. Microbiol., 87: 949-956.

Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. Arch. Microbiol., 169: 387-392.

Ibeas, J.I., Lozano, I., Perdigones, F., Jiménez, J. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* Strains in Sherry by a Nested PCR Method. Applied and Environmental Microbiology. Mar. 1996, p. 998–1003

Kurtzman, C.P., Fell, J.W. 1998. The yeasts, a taxonomic study 4th ed., Elsevier Science, Amsterdam.

López, I. 2004. Detección y control por técnicas de la Biología Molecular de bacterias lácticas autóctonas responsables de la fermentación maloláctica en vinos de D.O.Ca. Rioja. Tesis Doctoral. Universidad de La Rioja.

Pulvirenti, A., Giudici, P. 2003. Identification des levures par techniques moléculaires. Bulletin de l´O.I.V., 869-870: 635-649.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, L. 1990. PCR protocols. A guide to methods and applications. In *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics,* pp. 315-322. Edited by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White. San Diego: Academic Press.

Zahavi, T., Droby, S., Cohen, L., Weiss, B., Ben-Arie, R. 2002. Characterization of the yeast flora on the surface of grape berries in Israel. Vitis, 41 (4): 203-208.

4. Resultados

4.1. Estudio de las levaduras no-*Saccharomyces* presentes en uvas en la D.O.Ca. Rioja

Incluido en el trabajo realizado para la obtención del *Diploma de Estudios Avanzados* (DEA) y titulado "Estudio de las levaduras no-*Saccharomyces* que participan en la elaboración de vinos de la D.O.Ca. Rioja"

Programa de Doctorado en Ciencias Agrarias y Alimentarias
Universidad de La Rioja. Septiembre 2005

El vino es un producto natural resultado del metabolismo de los microorganismos presentes tanto en las uvas como en las instalaciones de la bodega, entre los que se encuentra una gran variedad de levaduras.

Las levaduras, fundamentalmente *S. cerevisiae*, realizan la transformación del azúcar en etanol. Pero además, esta especie y otras propias de los ecosistemas vitivinícolas también aportan gran cantidad de metabolitos secundarios que afectan al aroma y al sabor del vino de forma positiva o negativa, como ocurre con algunas levaduras alterantes.

Todas estas levaduras llegan al mosto por dos vías principales: por un lado, con las propias uvas, en las que estarían formando parte de la microbiota de su superficie junto a mohos y bacterias, y, por otro lado, de la propia bodega y el material de la misma, "colonizados" por las levaduras procedentes de vendimias y elaboraciones anteriores.

La diversidad de especies varía de una zona geográfica a otra, y de una época a otra, debido a la influencia de las diferencias en la temperatura, las lluvias, el tipo de insectos, la sanidad de la uva, las prácticas culturales, etc., aunque casi siempre se observan los mismos géneros (Jolly et al., 2003).

El estudio de las levaduras propias de los viñedos de una región determinada es necesario para conocer cuáles son los géneros o especies mejor adaptados a un ecosistema concreto y, así, poder estudiar su posible utilización en fermentaciones dirigidas, o tomar medidas para evitar contaminaciones indeseables.

Este trabajo es una primera aproximación al estudio de las poblaciones de levaduras presentes en las viñas de la D.O.Ca. Rioja, dado que apenas hay trabajos anteriores al respecto. En el mismo se estudió la población de levaduras presentes en uvas procedentes de parcelas de esta región en dos vendimias consecutivas. Los objetivos fueron dos:

1. Conocer la diversidad cualitativa de especies de levaduras presentes en las uvas de la D.O.Ca. Rioja.

2. Conocer la importancia cuantitativa de cada una de las especies presentes en las uvas de esta región.

Se realizaron dos ensayos. En el primero de ellos se tomaron dos muestras de uvas procedentes de tres subzonas de Rioja (Rioja Baja, Media y Alta), una semana antes de la vendimia y un día antes de la misma.

Las muestras fueron sembradas e incubadas para realizar el recuento de levaduras. De las colonias obtenidas se seleccionaron 10 de cada muestra en función de su diferente morfología (color, brillo, forma, tamaño) para su identificación dentro de un estudio cualitativo.

El segundo de los ensayos se realizó al año siguiente con uva procedente de la parcela de la zona de Rioja Baja. Se recogieron muestras de uva en distintos momentos del periodo de maduración: 12 días, 9 días y 1 día antes de la vendimia. Se sembraron e incubaron para el recuento de levaduras y posteriormente se seleccionaron 25 colonias al azar de cada muestra para su identificación como parte del estudio cuantitativo.

En ambos casos la identificación de las levaduras se llevó a cabo utilizando la técnica de PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS del DNA ribosómico y mediante la secuenciación del producto de amplificación por PCR de la región D1/D2.

Evolución de la población de levaduras en las uvas durante la maduración

Los recuentos de levaduras realizados en las uvas se muestran en la Tabla 1. En el primer año se observó que las poblaciones en Rioja Alta y Rioja Baja fueron muy similares en los dos momentos analizados, con valores del orden de 10^4 UFC/baya, y que experimentaron un ligero aumento al madurar la uva. En Rioja Media los recuentos realizados siete días antes de la vendimia fueron inferiores, del orden de 10^2 UFC/baya. Sin embargo, en esta zona se produjo un importante aumento de la población entre los dos muestreos, aunque no llegó a alcanzar los valores observados en las otras zonas.

En el segundo año de estudio en la zona de Rioja Baja se detectó un descenso en la población de levaduras en las uvas a medida que avanzaba la maduración: los recuentos en los

dos primeros muestreos fueron del orden de 10^4 UFC/baya y de 10^3 UFC/baya en el tercero. Esta disminución fue contraria al aumento de las poblaciones de levaduras en uvas detectado en la campaña anterior y podría deberse a las condiciones climáticas que afectaron al viñedo en ese espacio de tiempo.

Los recuentos de levaduras por grano de uva estuvieron dentro de los valores descritos como normales por algunos autores con anterioridad en otras zonas (Renouf et al., 2006). Este grupo, en un trabajo realizado en Burdeos durante tres vendimias sucesivas, encontró valores comprendidos entre 10^3-10^5 UFC/baya.

Tabla 1.- Recuento de levaduras (UFC/baya) en la superficie de las uvas.

Zona de muestreo	PRIMER AÑO		SEGUNDO AÑO		
	7 días antes de la vendimia	1 día antes de la vendimia	12 días antes de la vendimia	9 días antes de la vendimia	1 día antes de la vendimia
Rioja Alta	$2,4 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	-	-	-
Rioja Media	$5,8 \times 10^2$	$3,7 \times 10^3$	-	-	-
Rioja Baja	$2,1 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$	$9,2 \times 10^4$	$7,4 \times 10^4$	$5,3 \times 10^3$

Identificación de las levaduras presentes en las uvas durante el período de maduración

Estudio cualitativo

El primer año se realizó un estudio cualitativo de las especies presentes en las uvas sin atender a su frecuencia de aparición. Se caracterizaron molecularmente 60 colonias (10 aislamientos en cada muestreo). Se encontraron siete patrones genéticos diferentes (Tabla 2). Al comparar estos patrones con los perfiles existentes en la bibliografía, sólo se identificaron cuatro de ellos: *Cryptococcus magnus, M. pulcherrima, K. apiculata* y *C. stellata*. Los tres patrones restantes se identificaron mediante secuenciación de su genoma, y correspondieron a las especies: *A. pullulans*, *Rhodotorula glutinis* y *Candida stellimalicola*.

Tabla 2. Presencia(●) de distintas especies de levaduras en las uvas durante el estudio cualitativo realizado el primer año.

Especies	Rioja Alta		Rioja Media		Rioja Baja	
	7 días	1 día	7 días	1 día	7 días	1 día
Cryptococcus magnus	●	●	●	●	●	●
Aureobasidium pullulans	●	●	●	-	-	-
Metschnikowia pulcherrima	-	-	●	●	-	-
Kloeckera apiculata	-	-	-	●	●	●
Candida stellata	-	-	-	-	●	●
Candida stellimalicola	-	-	-	●	-	-
Rhodotorula glutinis	-	●	●	●	-	-

La especie *C. magnus* es la única que se detectó en los seis muestreos realizados. No es una levadura de importancia enológica, pues no posee metabolismo fermentativo (Esteve-Zarzoso et al., 1999), pero sí es un género frecuente en las uvas (Guillamón, 1996; Beltrán et al., 2002; Querol y Fleet, 2006).

La especie *A. pullulans* fue detectada en Rioja Alta y en Rioja Media. A diferencia de otros autores (Renouf et al., 2005), que sólo la encontraron en bayas no maduras, en este trabajo se identificó en Rioja Alta al final de la maduración. Una de las características importantes desde el punto de vista enológico de esta especie es su capacidad para reducir el crecimiento de *Botrytis cinerea* en la superficie de las uvas (Schena et al., 2003), y, por lo tanto, disminuir la podredumbre de la vendimia.

La especie *M. pulcherrima* es citada en bibliografía como una de las no-*Saccharomyces* más habituales en la uva y las primeras fases de la fermentación (Pretorius et al., 1999; Zambonelli et al., 2004). Sin embargo, en este estudio sólo se encontró en Rioja Media.

En la zona de Rioja Baja se identificaron dos de las especies no-*Saccharomyces* más importantes en enología: *K. apiculata* y *C. stellata.* Numerosos trabajos citan a la primera como la levadura no-*Saccharomyces* de mayor frecuencia en uvas y fermentaciones alcohólicas (Constantí et al., 1997 y 1998; Pretorius et al., 1999; Heard, 1999; Capece et al., 2003; Más et al., 2004; Fernández-González et al., 2004). La especie *C. stellata* ha sido descrita por los mismos autores como la principal levadura acompañante de *K. apiculata* en uvas y mostos y como la mayoritaria en uvas botritizadas por otros autores (Antunovics et al., 2003).

Por su parte, *C. stellimalicola* es una levadura que no se ha descrito anteriormente asociada al sector enológico, aunque es posible que en trabajos previos haya sido recogida dentro del grupo *Candida* spp. Sin embargo, se ha encontrado en otras frutas (Suzuki et al., 1994) y otras fermentaciones (Jespersen et al., 2005).

R. glutinis es una levadura raramente descrita en enología y que en el presente estudio se aisló en uvas de Rioja Alta y Media. Tiene capacidad para inhibir ciertas podredumbres en el cultivo por lo que ha sido objeto de estudios como agente de biocontrol (Renouf y Lonvaud-Funel, 2006). Es una levadura que secreta el enzima α-L-arabinofuranosidasa (Martínez et al., 2006), por lo que tiene un interesante potencial biotecnológico en enología.

En ningún caso se aisló la especie *S. cerevisiae* en las uvas. En trabajos anteriores se ha señalado que esta levadura se encuentra en las bayas en poblaciones tan bajas que no suele ser detectada en los muestreos habituales (Fleet et al., 1984; Lema y García, 2000).

Como se refleja en la Tabla 2, se observó un aumento en la diversidad de especies presentes a medida que maduraban las uvas, principalmente en Rioja Media. Este hecho podría estar relacionado con el estado de la baya madura: mayor superficie de adhesión y mejor acceso a los nutrientes para la micobiota adherida (Renouf et al., 2005).

Las diferencias encontradas en la composición de las poblaciones entre las zonas podrían deberse, igual que las variaciones en los recuentos, a las diferencias climáticas y a las prácticas culturales de cada viñedo (Strauss et al., 2001; Jolly et al., 2003). En este sentido, se ha llegado a afirmar que cada baya tiene una carga microbiana específica diferente (Mortimer y Polsinelli, 1999).

Estudio cuantitativo

En el segundo año se realizó un estudio cuantitativo con el fin de determinar la importancia relativa de cada especie en el conjunto de la población de levaduras. Se identificaron 25 colonias en cada muestreo, por lo que sólo se detectaron las levaduras presentes en un porcentaje superior al 4%. Se encontraron cinco especies de levaduras diferentes (Tabla 3), que ya fueron detectadas en el estudio cualitativo realizado el año anterior.

Tabla 3. Porcentajes (%) de aparición de distintas especies de levadura en las uvas. Estudio cuantitativo realizado el segundo año.

Especies	12 días antes de la vendimia	9 días antes de la vendimia	1 días antes de la vendimia
Cryptococcus magnus	12		24
Aureobasidium pullulans	76	4	44
Metschnikowia pulcherrima			8
Kloeckera apiculata		96	24
Rhodotorula glutinis	12		

La especie *C. magnus* se detectó en dos de los tres muestreos realizados, pero su presencia no fue elevada (12-24%).

La especie *A. pullulans* estuvo presente en todos los muestreos y fue mayoritaria en la muestra obtenida 12 días antes de la vendimia (76%). Esta levadura, considerada como especie típica de bayas inmaduras (Renouf et al., 2005), también se identificó un día antes de la vendimia en un elevado porcentaje (44%).

K. apiculata se detectó por primera vez en el muestreo realizado nueve días antes de la vendimia, representando el 96% de la población total y disminuyó posteriormente en el muestreo final. Los resultados observados en este muestreo coinciden con lo expuesto en

otros trabajos que afirman que la especie *K. apiculata* es la más frecuente en las uvas (Constantí et al., 1997).

También se puso de manifiesto en este segundo año un aumento de la diversidad al madurar las uvas. En el muestreo realizado un día antes de la vendimia se encontraron cuatro de las cinco especies identificadas ese año. La especie mayoritaria fue *A. pullulans* (44%) seguida de *K. apiculata* (24%) y *C. magnus* (24%). También se encontró la especie *M. pulcherrima* (8%). El aumento en la diversidad estaría relacionado con la maduración de la uva y su integridad (Mortimer y Polsinelli, 1999).

Aunque en trabajos anteriores se señalan los géneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora* y *Candida* como los más frecuentes en uvas, también se reconoce que la micobiota propia de las mismas es muy variable (Strauss et al., 2001). Así, en este trabajo se observó que junto con *K. apiculata*, las especies *C. magnus* y *A. pullulans* constituyeron una parte importante de las levaduras presentes en las uvas, y, por el contrario, el género *Candida* no fue identificado en el estudio cuantitativo y únicamente en dos de las tres zonas estudiadas en el cualitativo.

Conclusiones

Las poblaciones de levaduras en las uvas al final de la maduración fueron del orden de 10^3-10^4 UFC/baya, observándose que durante el periodo de maduración la diversidad aumentó.

En el estudio cualitativo se identificaron siete especies diferentes. Las especies cuantitativamente más importantes fueron *A. pullulans*, *K. apiculata* y *C. magnus*. Esta última fue la única especie detectada en las tres zonas estudiadas en el primer ensayo.

Referencias bibliográficas

Antunovics, Z., Csoma, H., Sipiczki, M. 2003. Molecular and genetic analysis of the yeast flora of botritized Tokaj wines. Bulletin de l´O.I.V 867-868, 380-397.

Beltrán, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozès, N., Mas, A. 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. System Applied Microbiology 25, 287-293.

Capece, A., Salzano, G., Romano, P. 2003. Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. International Journal of Food Microbiology 84, 33-39.

Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A., Guillamón, J.M. 1997. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. Am. J. Enol. Vitic. vol. 48, Nº 2, 339-344.

Constantí, M., Reguant, C., Poblet, M., Zamora, F., Mas, A., Guillamón, J.M. 1998. Molecular analysis of yeast population dynamics: effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. Int. J. Food Microbiol. 41, 169-175.

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. Bacteriology 49, 329-337.

Fernández-González, M., Briones, A.I., Úbeda, J.F. 2004. Levaduras presentes durante la fermentación vínica: análisis comparativo entre los recuentos en medios sólidos y la técnica PCR-TTGE. Tecnología del vino, julio/agosto 04, 60-64.

Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S., Ribereau-Gayon, P. 1984. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. Applied and Environmental Microbiology 48, 1034-1038.

Guillamón Navarro, J.M. 1996. Estudio ecológico de la fermentación alcohólica mediante la utilización de marcadores moleculares. Tesis doctoral. Universidad de Valencia.

Heard, G. 1999. Novel yeasts in winemaking–looking to the future. Food Australia 51 (8), 347-352.

Jespersen, L., Nielsen, D.S., Honholt, S., Jakobsen, M. 2005. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. FEMS Yeast Res 5: 441-53.

Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S. 2003. The occurrence of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. S. Afr. Enol. Vitic. 24, Nº 2, 35-42.

Lema Costas, C., García-Jares, C. 2000. Influencia de las poblaciones de levaduras autóctonas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* en el aroma del vino albariño. Viticultura/Enología Profesional Nº 66, 52-64.

Martínez, C., Gertosio, C., Labbe, A., Pérez, R., Ganga, M.A. 2006. Production of *Rhodotorula glutinis*: a yeast that secretes α-L-arabinofuranosidase. Electronic Journal of Biotechnology 9,4, 407-413.

Mas, A., Hierro, N., Guillamón, J.M., González, A., Poblet, M., Rozès, N. 2004. Nuevas técnicas de identificación, detección y cuantificación de levaduras de importancia en enología. Tecnología del Vino, Enero/Febrero 04, 65-70.

Mortimer, R., Polsinelli, M. 1999. On the origins of wine yeast. Res. Microbiol. 150, 199-204.

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. S. Afr. Enol. Vitic. Vol. 20, Nº 2, 61-74.

Querol, A., Fleet, G. 2006. Yeasts in Food and Beverages. Amparo Querol, Graham Fleet (Eds.). Springer. 2006.

Renouf, V., Claisse, O., 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.

Renouf, V., Lonvaud-Funel, A. 2006. Complexité et importance des équilibres microbiens à la surface de la baie de raisins. Revue des oenologues 120, 28-32.

Renouf, V., Perello, MC., Strehaiano, P., Lonvaud-Funel, A. 2006. Global survey of the microbial ecosystem during alcoholic fermentation in winemaking. J. Int. Sci. Vin. 40 nº 2, 101-116.

Schena, L., Nigro, F., Pentimone, I., Liborio, A. 2003 Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. Postharvest Biology and Technology 30, 209-220.

Strauss, M.L.A., Jolly, N.P., Lambrechts, M.G., van Rensburg, P. 2001. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. J. Appl. Microbiol. 91, 182-190.

Suzuki, M., Nakase, T., Komagata, K. 1994. *Candida stellimalicola*, a new species of anamorphic yeast isolated from star apple in Thailand. Journal of General and Applied Microbiology 40, 115-121.

Zambonelli, C., Tini, V., Coloretti, F., Benevelli, M. 2004. I progressi della microbiologia. VigneVini 4, 72-77.

4.2. Análisis cuantitativo y cualitativo de levaduras no-*Saccharomyces* en fermentaciones alcohólicas espontáneas

Quantitative and qualitative analysis of non-*Saccharomyces* yeasts in spontaneous alcoholic fermentations

Artículo publicado en:

European Food Research & Technology

2010. Vol. 230, pág. 885-891

Factor de Impacto de la Revista según *Journal Citation Reports* (JCR): 1.585

Resumen

El vino es el resultado de numerosas reacciones bioquímicas llevadas a cabo en mayor medida por la levadura *S. cerevisiae* pero también por una gran variedad de especies que se desarrollan en las primeras fases de la vinificación espontánea aportando gran cantidad de metabolitos al vino.

Este trabajo tuvo como objetivo el estudio de las poblaciones de levaduras no-*Saccharomyces* presentes en fermentaciones espontáneas de la D.O.Ca. Rioja para conocer mejor este grupo de microorganismos y su posible uso en beneficio de una mayor calidad de los vinos.

Se realizaron dos ensayos diferentes. En el primero se estudió la diversidad específica de la población de levaduras a lo largo de la fermentación alcohólica espontánea de los vinos, sin tener en cuenta la frecuencia de aparición de cada una de las especies. Para ello, se tomaron muestras de tres vinificaciones diferentes de uvas procedentes de tres subzonas de la D.O.Ca. Rioja: Rioja Alta, Rioja Media y Rioja Baja. La toma de muestras tuvo lugar en nueve momentos: 0 (encubado), 6, 18, 24, 30, 42, 48, 120 (fermentación tumultuosa) y 216 horas (fin de fermentación). Tras el cultivo y recuento de las muestras en medio Agar Malta, de cada una de ellas se seleccionaron diez colonias basándose en su diferente morfología.

En el segundo ensayo, llevado a cabo en la vendimia siguiente, se determinó la contribución cuantitativa de cada una de las especies encontradas a lo largo de una fermentación alcohólica espontánea. En este ensayo se tomaron muestras de una sola vinificación de uvas procedentes de la zona de Rioja Baja en diez momentos: 0 (encubado), 8, 20, 32, 44, 56, 72, 96, 120 (fermentación tumultuosa) y 216 horas (fin de fermentación). Se cultivó en medio Agar Malta y tras el recuento se seleccionaron 25 colonias al azar de cada una de las muestras.

Todas las levaduras seleccionadas en los dos ensayos fueron sometidas a la técnica de PCR-RFLP de la región 5.8S-ITS del DNA ribosómico para proceder a su identificación a partir de los perfiles genéticos obtenidos y su comparación con los obtenidos de diversas

bases de datos de otros autores. Algunas levaduras no pudieron identificarse mediante este procedimiento por lo que se recurrió a la secuenciación del producto amplificado por PCR.

En el primer ensayo se identificaron en total 17 especies diferentes, incluyendo a *S. cerevisiae*. En la elaboración de Rioja Alta se encontraron 12 especies diferentes, en la de Rioja Media 7 y en la de Rioja Baja 14 especies.

C. stellata y *K. apiculata* fueron las dos únicas especies encontradas repetidamente en las tres elaboraciones y se detectaron hasta la fermentación tumultuosa en las elaboraciones de Rioja Media y Baja. Se identificaron otras especies en sucesivos muestreos, pero solo en una de las elaboraciones: *Pichia* sp en Rioja Alta, *M. pulcherrima* y *Zygosaccharomyces veronae* en Rioja Media e *I. orientalis* y Z. *bailii* en Rioja Baja, lo que podría deberse a la diferente carga microbiana de cada uva o a las características de cada mosto.

Todas esas levaduras ya habían sido relacionadas con las fases tempranas de la vinificación por otros autores, así como otras especies y géneros encontrados esporádicamente en las elaboraciones realizadas (*T. delbrueckii*, *Rhodotorula rubra*, *A. pullulans* e *Issatchenkia* sp).

También se identificaron especies no relacionadas previamente con la vinificación, como *Candida sorboxylosa*, *C. stellimalicola* y *Z. helenicus*.

En todos los casos, en el muestreo de fin de fermentación solo se detectó *S. cerevisiae*. Además, se comprobó cómo el desarrollo de esta especie condicionó la presencia a lo largo del tiempo de las levaduras no-*Saccharomyces*. Así, en la elaboración de Rioja Alta en la que *S. cerevisiae* fue detectada desde el primer momento, no se identificó ninguna especie más a las 48 horas del encubado, a diferencia de las otras elaboraciones en las que se detectaron no-*Saccharomyces* hasta las 120 horas del encubado.

En el ensayo llevado a cabo el segundo año se identificaron siete especies diferentes a lo largo de la fermentación, incluyendo *S. cerevisiae*. Todas ellas habían sido ya detectadas en el ensayo del año anterior.

Dos especies, *C. stellata* y *K. apiculata*, se identificaron en altas proporciones (más del 80% de las colonias estudiadas entre las dos) hasta el muestreo de las 72 horas. *S. cerevisiae* fue detectada por primera vez a las 56 horas del encubado, en una proporción del

4% de la población. Por su parte, levaduras del género *Pichia* fueron identificadas en repetidos muestreos hasta las 72 horas y las especies *I. terricola* y *M. pulcherrima* fueron detectadas solo en uno de los momentos, a las 8 horas del encubado, en una proporción muy baja.

En este trabajo se comprobó que las especies no-*Saccharomyces* mejor adaptadas a las fermentaciones estudiadas, de entre la considerable diversidad de especies que se detectó en estos ensayos, fueron *C. stellata* y *K. apiculata*, dada su repetida aparición en las tres elaboraciones del primer año y su elevada proporción poblacional en la elaboración del segundo año. Esto debe llevar a la conclusión de que el metabolismo de estas levaduras puede tener un importante impacto sobre el resultado final de la vinificación.

4.3. Presencia de levaduras no-*Saccharomyces* en el equipamiento de la bodega y en el mosto en la época de vendimia

Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time

Artículo publicado en:

Food Microbiology

2010. Vol. 27, pág. 1023-1027

Factor de Impacto de la Revista según *Journal Citation Reports* (JCR): 3.320

Resumen

Las levaduras presentes en las fermentaciones alcohólicas espontáneas de los mostos proceden de la propia uva. Pero, además, existe otra fuente de microorganismos que puede actuar como origen de las levaduras encontradas durante esas fermentaciones o incluso en vinos terminados: las superficies y el material de la bodega, con los que entran en contacto la uva, el mosto o el vino durante su procesado.

Los estudios acerca de las levaduras presentes en el material de bodega se han centrado hasta ahora fundamentalmente en la especie *S. cerevisiae* y su diversidad intraespecífica, por lo que el objetivo de este trabajo fue estudiar la población de levaduras no-*Saccharomyces* en las superficies del material de cuatro bodegas de la D.O.Ca. Rioja. También se estudiaron las levaduras presentes en los primeros mostos encubados en cada bodega para determinar si había coincidencia entre las especies de ambos medios.

El estudio se realizó en una bodega de cada subzona de la D.O.Ca. Rioja: Baja, Media, Alta y Alavesa (bodegas 1, 2, 3 y 4, respectivamente). Se tomaron muestras de las superficies de las instalaciones de las bodegas, antes de la entrada de la primera uva de la campaña, en diez puntos diferentes: tolva de recepción, despalilladora, estrujadora, bomba de pastas, pared del depósito de fermentación, boca de salida del depósito, prensa neumática, bomba de trasiego, suelo de la bodega y pared de la bodega.

Se utilizaron placas Rodac con medio de cultivo CGA para la recogida de esas muestras y tras su incubación se realizó el recuento y se seleccionaron al azar cinco colonias de cada placa para su identificación.

Además, se tomó una muestra del mosto del primer depósito encubado en la campaña en cada bodega a las 24 horas del llenado del mismo. Tras la siembra de las muestras en medio de cultivo CGA y posterior incubación, de cada una se seleccionaron 10 colonias para su identificación. Todas ellas, tanto las obtenidas de las superficies como las del mosto, fueron identificadas mediante la técnica de PCR-RFLP aplicada a la región 5.8S-ITS del ADN ribosómico.

Las levaduras identificadas en las superficies se clasificaron en los siguientes grupos: géneros no fermentativos ni presentes en vinificaciones (I), géneros y especies con cierta capacidad fermentativa y de desarrollo en vinificaciones o en vino almacenado (II) y la especie *Saccharomyces cerevisiae* (III).

Considerando el conjunto de las cuatro bodegas estudiadas, el 26% de las levaduras identificadas procedentes de las instalaciones (media de las cuatro bodegas) pertenecía al grupo I. Los grupos II y III, formados por especies que participan de una forma u otra en las vinificaciones, representaron el 38% y el 36% respectivamente. El conjunto de los grupos I y II, formado por levaduras no-*Saccharomyces*, supuso el 64% del total de colonias identificadas.

En la bodega 4, a diferencia de las otras tres, solo se aislaron levaduras en cuatro de los diez puntos de muestreo, lo que pudo atribuirse al diferente método de limpieza empleado: las instalaciones de esta bodega se limpiaron con una solución de metabisulfito potásico, mientras que en las otras tres se hizo con una solución de hidróxido de sodio y posterior enjuague con agua.

La especie *S. cerevisiae* fue mayoritaria solo en seis puntos de muestreo del total de 30 en los que fue detectada, lo que contradice la idea de que sea la especie dominante en la colonización de superficies en las bodegas, si bien fue identificada en las cuatro bodegas.

El resto de aislados pertenecía al grupo no-*Saccharomyces*. En total, entre las cuatro bodegas, se identificaron 18 especies diferentes en las superficies, ocho de las cuales se encontraron en la bodega 1; nueve en la bodega 2; nueve en la bodega 3 y cuatro en la bodega 4. Los géneros a los que pertenecían esas especies fueron: *Cryptococcus, Aureobasidium, Torulaspora, Kloeckera, Pichia, Metschnikowia, Candida, Rhodotorula, Debaryomyces y Zygosaccharomyces*, siendo *Pichia* y *Cryptococcus* los únicos no-*Saccharomyces* identificados en las instalaciones de las cuatro bodegas. A diferencia de lo referido por otros autores, no se detectó la presencia de *B. bruxellensis*, quizá debido a la utilización de un medio de cultivo no específico para esta levadura.

Con respecto a la muestra analizada de los mostos a las 24 horas del encubado, se identificaron las especies *K. apiculata* en las bodegas 1, 2 y 3, *Z. veronae* en la bodega 1 y *Candida* sp en la bodega 4. La única especie aislada tanto en las superficies de la bodega

como en el mosto de la misma fue *Z. veronae*, lo que podría señalar la transmisión de esa especie desde el material hasta la uva encubada.

En conclusión, se observó la importante presencia de las levaduras no-*Saccharomyces* en las superficies de las bodegas, incluso después de la limpieza de las mismas, muy por encima de la población de *S. cerevisiae*. Estas especies pueden ser transferidas por contacto con la uva o el mosto a los depósitos en fermentación, por lo que su posible contribución en las fermentaciones alcohólicas y en los vinos debe ser tomada en cuenta.

4.4. Análisis de las levaduras presentes en el aire de una bodega a lo largo de un año

Analysis of airborne yeasts in one winery over a period of one year

Artículo publicado en:

Food Control

2013. Vol. 30, pág. 585-589

Factor de Impacto de la Revista según *Journal Citation Reports* (JCR): 2.953

Resumen

La diseminación de levaduras en una bodega ocurre mediante la manipulación del material de la bodega, del persona, y también a través del aire, tanto de levaduras participantes en la fermentación alcohólica como levaduras de contaminación. Numerosos estudios se han realizado acerca de la ecología microbiana de las bodegas, centrándose en las poblaciones de levaduras presentes en las superficies y en el material de bodega, así como en los mostos y vinos almacenados. Sin embargo, la población levaduriforme que puede detectarse en el aire de las bodegas no ha sido apenas estudiada.

En este trabajo se planteó el objetivo de conocer la población de levaduras presentes en el aire de una bodega a lo largo de un año, estudiando cuatro zonas diferenciadas: nave de elaboración, nave de crianza en barrica, nave de crianza en botella y nave de embotellado.

Para ello se tomaron muestras de aire en una bodega de la D.O.Ca. Rioja mensualmente durante un año con el muestreador de aire airIDEAL 3P. Se emplearon dos medios de cultivo, CGA, medio genérico para levaduras, y MR, medio de revitalización con un filtro de 0.45 µm que posteriormente fue transferido a medio DBDM, selectivo para los géneros *Brettanomyces/Dekkera*.

Tras la incubación de las muestras se realizaron los recuentos poblacionales y se seleccionó un máximo de diez colonias al azar de cada una de ellas para su identificación mediante la técnica de PCR-RFLP aplicada a la región 5.8S de la región ITS del ADN ribosómico. En algunos aislados la identificación se realizó mediante la secuenciación del fragmento amplificado por PCR de los dominios D1 y D2 del gen 26S del ADN ribosómico.

En general, en las cuatro zonas estudiadas se detectaron poblaciones bajas de levaduras en el aire, inferiores a 20 NMP/m^3, a lo largo de todo el año. Sin embargo, se detectó un aumento importante en la población en la nave de elaboración durante las vinificaciones (octubre), relacionado con el aumento de actividad en la bodega y con la fermentación alcohólica que estaba teniendo lugar en los depósitos. Por ello, la mayoría de las levaduras identificadas en el aire en ese momento pertenecían a la especie *S. cerevisiae*. Por

otra parte, en la zona de embotellado se produjeron los recuentos más altos de forma continua, lo que podría atribuirse a que es una zona que presenta actividad en cualquier de la época del año. En las zonas de crianza en barrica y en botella, situadas ambas en una planta inferior de la bodega estudiada, se detectaron poblaciones algo menores, sin variaciones a lo largo del periodo estudiado.

En cuanto a los géneros y especies identificados, la gran mayoría pertenecía al grupo no-*Saccharomyces*, siendo levaduras con escasa o nula actividad fermentativa. Los géneros mayoritarios fueron *Cryptococcus*, que además presentó la mayor diversidad específica con 11 especies diferentes, y *Sporidiobolus*. Otros géneros identificados fueron *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Aureobasidium, Sporobolomyces, Williopsis*, *Torulaspora*, *Bullera* y *Saccharomyces*. En general, son levaduras consideradas como indicadoras del nivel de higiene que, normalmente, en condiciones adecuadas de manipulación, no producen contaminaciones en el vino, a excepción de los géneros *Candida* y *Pichia*. El género *Dekkera*/*Brettanomyces*, importante levadura de alteración, no fue detectado ni siquiera en el medio específico DBDM.

Por zonas, se observó el predominio de ciertos géneros en alguna de ellas: en la nave de crianza en barrica se detectó una mayoría de los géneros *Debaryomyces* y *Sporobolomyces*, y en la zona de embotellado predominaron *Candida* y *Sporidiobolus*.

Tres géneros fueron detectados exclusivamente en la zona de embotellado: *Torulaspora, Williopsis* y *Bullera*. Dado que estas dos últimas no se detectan normalmente en uvas, vinos o bodegas, probablemente procederían del material auxiliar utilizado en el embotellado. Esta zona, que fue la que presentó la mayor población a lo largo del año, también mostró la mayor diversidad, con 12 géneros diferentes. Este resultado indicaría que es el lugar de la bodega con mayor riesgo de contaminación del vino a partir del aire en un momento delicado, puesto que el embotellado es el proceso previo a su salida al mercado.

S. cerevisiae solo fue detectada en la zona de elaboración durante el periodo de vinificación de forma mayoritaria (80%), y, en menor medida, en la zona de embotellado, zona anexa a la anterior.

Los resultados de este estudio permiten afirmar que hay una gran diversidad de especies de levaduras en el aire de una bodega, con poblaciones que se mantienen estables a

lo largo del año si se mantiene el nivel de actividad. Estas poblaciones son más elevadas cuando hay más actividad en la bodega, con una mayor diseminación de microorganismos en el aire.

4.5. Estudio de las levaduras del aire de las bodegas y el riesgo de contaminación del vino

Screening of yeast mycoflora in winery air samples and their risk of wine contamination

Artículo publicado en:

Food Control

2013. Vol. 34, pág. 261-267

Factor de Impacto de la Revista según *Journal Citation Reports* (JCR): 2.953

Resumen

El conocimiento de la diversidad de microorganismos presentes en las bodegas es fundamental, así como los mecanismos de diseminación de los mismos, ya que pueden dar lugar a contaminaciones en los vinos durante su almacenamiento y crianza. El aire actúa como vehículo transportador de levaduras y otros microorganismos, sobre todo cuando se está manipulando el mosto o el vino, por lo que puede ser una fuente de diseminación y contaminación en las bodegas.

Algunos géneros y especies de levaduras pueden afectar negativamente a la calidad de los vinos, como es el caso de *B. bruxellensis*, productora de etilfenoles que aportan olores desagradables de tipo animal. En los últimos años se están realizando numerosos estudios para aproximarse a su ecología, origen y diseminación en las bodegas, donde algunos autores ya han detectado su presencia en muestras de aire.

En el trabajo anterior se recabaron datos acerca de la composición cualitativa y cuantitativa de la micobiota del aire de una bodega y en este se pretende extender el estudio a tres bodegas para comparar los resultados en distintas condiciones y, así, considerar el riesgo de contaminación microbiológica a través del aire.

En estas bodegas se tomaron muestras de aire de cuatro zonas: nave de elaboración, nave de crianza en barrica, nave de crianza en botella y nave de embotellado, en cuatro épocas del año: primavera, verano, otoño e invierno. Cada bodega tenía una distribución, tamaño y edad diferentes a las otras.

Se utilizó el muestreador de aire airIDEAL 3P empleando dos medios de cultivo, CGA, genérico para levaduras y MR, medio de revitalización con un filtro de 0.45 µm que posteriormente fue transferido para su incubación a medio DBDM, selectivo para el género *Brettanomyces/Dekkera*. Se realizaron los recuentos de colonias y se seleccionó un máximo de diez de ellas al azar de cada muestra para su identificación con la técnica de PCR-RFLP aplicada a la región 5.8S de la región ITS del ADN ribosómico. La identificación de *B. bruxellensis* se realizó mediante la técnica de PCR anidada.

Se obtuvieron recuentos bajos de levaduras en el aire en la mayoría de los muestreos (inferiores a 20 NMP/m^3), detectándose la influencia de las actividades llevadas a cabo en cada momento en las diferentes zonas. Así, en las tres bodegas hubo un aumento de la población de levaduras en el aire de la zona de elaboración durante la época en que tuvieron lugar las vinificaciones. En las zonas de embotellado se encontraron asimismo mayores poblaciones de levaduras cuando estaba en funcionamiento la línea de embotellado. Por otro lado, en las zonas de crianza en botella y crianza en barrica, se detectaron poblaciones más bajas, debido a la escasa actividad en las mismas, excepto en la segunda bodega, con un mayor recuento de levaduras en la zona de barricas, comunicada con el exterior de la bodega, y con mayores movimientos de aire, lo que podría ser la causa de esa mayor población.

La mayoría de las levaduras aisladas en el aire de las tres bodegas pertenecían al grupo no-*Saccharomyces*, detectando *S. cerevisiae* sólo en el aire de la zona de elaboración durante el periodo de vinificación. En general, se encontraron de forma continua en las tres bodegas los géneros *Aureobasidium* y *Cryptococcus*, aunque también se encontraron pequeñas diferencias entre bodegas en cuanto a la presencia de géneros minoritarios, diferencias que podrían deberse al distinto grado de adaptación de cada uno de ellos a cada ecosistema, el denominado "efecto bodega". La mayoría de las levaduras identificadas pertenecían al grupo de los Ascomicetos esporulados, Basidiomicetos y levaduras productoras de mucílagos, ya descritos anteriormente como parte de los microorganismos presentes en el aire de fábricas de bebidas, cuyas características les hacen adaptarse mejor a las condiciones estresantes del aire.

La zona de la embotelladora, que presentó en general los mayores recuentos de levaduras, podría ser la zona de mayor riesgo de contaminación de los vinos. Sin embargo, en este estudio, tanto los géneros encontrados de forma continua a lo largo del año en esa zona (*Cryptococcus*, *Sporidiobolus* o *Rhodotorula*), como otros identificados de forma más puntual (*Debaryomyces, Williopsis* o *Aureobasidium*) son levaduras con escasa o ninguna capacidad de colonizar y contaminar el vino, a no ser que se manipule inadecuadamente.

En cuanto al medio de cultivo DBDM, se obtuvieron recuentos sensiblemente inferiores a los obtenidos en el medio CGA, todos inferiores a 2 NMP/m^3, a excepción de uno de 5 NMP/m^3 y otro de 18 NMP/m^3 en la zona de barricas de dos de las bodegas. De todos los aislamientos realizados en este medio de cultivo (109 en total), la especie *B. bruxellensis* fue identificada únicamente en la muestra tomada en verano en la zona de barricas de una de las

bodegas, donde se aislaron 53 colonias pertenecientes a esta especie. Cuando tuvo lugar la toma de muestras se estaban llenando unas barricas con un vino, que, tras su análisis, evidenció la presencia de esa levadura y de altos niveles de etilfenoles. Con ello se confirmó la influencia de la manipulación del vino en la proyección de levaduras al aire y la diseminación de microorganismos a través del mismo. Por ello, la manipulación de vinos contaminados con esta levadura necesita la adopción de medidas preventivas para evitar el paso de los microorganismos al aire y de ahí a otros vinos.

4.6. Comparación de medios de cultivo para la recuperación de levaduras presentes en el aire de bodegas

Comparison of culture media for the recovery of airborne yeasts in wineries

Artículo publicado en:

Letters in Applied Microbiology

2013. Vol. 57, pág. 241-248

Factor de Impacto de la Revista según *Journal Citation Reports* (JCR): 1.629

Resumen

El aire es un medio de diseminación de microorganismos en las bodegas. Estos microorganismos pueden participar en la elaboración de los vinos y también alterarlos. De entre ellos, los más importantes son las levaduras porque realizan la fermentación alcohólica, pero también hay que considerar algunos géneros alterantes como *Pichia* o *Brettanomyces* por su influencia en la calidad de los vinos.

Las levaduras normalmente se encuentran en poblaciones bajas en el aire, por lo que para detectarlas es necesario recurrir a aerobiocolectores que analizan un volumen de aire considerable en poco tiempo. El aire recogido debe impactar en medios de cultivo adecuados para el recuento y la posterior identificación de los microorganismos. Además, las levaduras presentes en el aire están sometidas a una situación de estrés debido a factores como la deshidratación o la ausencia de nutrientes. Esto hace más difícil su desarrollo en ciertos medios de cultivo selectivos, que suponen un factor adicional de estrés. Para paliar estas dificultades se recomienda el uso de medios de revitalización, que facilitan la recuperación de microorganismos desde ecosistemas estresantes.

En este trabajo se evaluó el uso de distintos medios de cultivo para recuperar las especies de levaduras presentes en el aire de las bodegas que pueden determinar la calidad de los vinos utilizando un muestreador de aire que permitía recoger un volumen de aire adecuado.

Se tomaron muestras de aire en cuatro bodegas de la D.O.Ca. Rioja y los muestreos se realizaron en cuatro momentos del año: primavera, verano, otoño (época de elaboración) e invierno, y en cuatro zonas: nave de elaboración, embotelladora, nave de crianza en barrica y nave de crianza en botella.

Se utilizó el colector de aire airIDEAL 3P (BioMérieux). Los medios de cultivo utilizados en cada uno de los muestreos fueron CGA, medio genérico para levaduras, AL, comúnmente utilizado para el aislamiento de levaduras no-*Saccharomyces*, y MR con un filtro

de papel de 0.45 µm, utilizado como medio de revitalización para el medio de cultivo DBDM, específico para el género *Brettanomyces/Dekkera*.

Tras la incubación y los recuentos, se seleccionaron diez colonias al azar de cada una de las placas, que fueron identificadas molecularmente con la técnica de PCR-RFLP.

Se obtuvo un total de 192 placas de cultivo. En 63 de ellas no se detectó crecimiento alguno, en otras 71 hubo un crecimiento inferior a 10 colonias por placa y en las restantes 58 el crecimiento fue mayor a 10 colonias. Los recuentos, por tanto, fueron muy bajos, a excepción de los obtenidos en las zonas de elaboración en la época de vinificación (otoño).

El medio CGA proporcionó los mayores recuentos (54% del total de colonias), sobre todo en otoño en la zona de elaboración y en primavera e invierno en las zonas de embotellado y crianza en barrica, coincidiendo con momentos de mayor manipulación de mosto o vino en esas zonas. En el medio AL se recogió el 40% del total de las colonias, con los mayores recuentos también en otoño en la zona de elaboración. En el medio DBDM se encontraron los recuentos más bajos, solo el 6% del total de las colonias encontradas, debido probablemente a la gran selectividad de este medio de cultivo.

En cuanto a las identificaciones realizadas, se encontraron 17 géneros diferentes en total: 12 de ellos en CGA, 14 en AL y 10 en DBDM.

El medio DBDM, a pesar de estar diseñado para detectar el género *Brettanomyces/Dekkera*, también permite el crecimiento de otras levaduras. En cualquier caso, este fue el único que permitió el crecimiento de la especie *B. bruxellensis*.

En cuanto a la diversidad específica, se encontraron 44 especies distintas entre los tres medios de cultivo: 27 de ellas crecieron en CGA y cinco de éstas sólo en este medio; 34 crecieron en AL, 11 de las cuales lo hicieron exclusivamente en este medio; 11 especies diferentes crecieron en DBDM, y solo 4 de ellas únicamente en este medio.

La especie *S. cerevisiae* fue detectada en los medios CGA y AL. Otras especies y géneros fueron detectados en los tres medios, como *K. apiculata, D. hansenii, Candida, Pichia o Aureobasidium.*

En conclusión, los medios de cultivo CGA y AL permitieron el crecimiento de levaduras del aire sin necesidad de una fase de resucitación. El medio CGA parece el más indicado para realizar recuentos más fieles desde un punto de vista cuantitativo, ya que proporcionó los mayores valores en número de colonias por volumen de aire. Sin embargo, el medio AL parece el más indicado para estudios de diversidad, pues presentó la mayor variedad de géneros y especies. El medio DBDM fue el único que permitió la detección de la especie *B. bruxellensis*, gracias a su composición y las condiciones de incubación, aunque con una fase previa de revitalización en medio MR.

5. Discusión general

Este trabajo pretende dar una visión de las levaduras presentes en distintos ecosistemas vitivinícolas, estudiando sus poblaciones y su diversidad, desde la primera fuente de microorganismos, la uva, hasta la micobiota presente en distintos elementos de las bodegas, como los equipos, materiales, o el aire de las mismas.

Todas esas levaduras pueden participar de forma importante en los procesos relacionados con la vinificación, tanto en la preservación de la calidad sanitaria de las uvas y su efecto sobre otros microorganismos, como en la fermentación, o en alteraciones de los vinos durante su crianza y almacenamiento en las bodegas. Por ello se realizó un estudio de cada uno de los ecosistemas en los que podemos encontrar esas levaduras.

Los dos primeros trabajos de esta tesis van enlazados, pues en el primero de ellos se estudiaron las levaduras presentes en cuatro muestras de uvas de la región y en el segundo se estudiaron las levaduras presentes en los mostos de esas uvas después de ser procesados en bodega y a lo largo de su fermentación alcohólica espontánea.

En el estudio de la uva realizado en dos campañas consecutivas, las poblaciones de levaduras al final de la maduración siempre estuvieron dentro del orden de 10^3-10^4 UFC/baya. Sin embargo, no se pudo concluir que un mayor grado de madurez de la baya implicara siempre un aumento en las poblaciones, puesto que el primer año las poblaciones de levaduras eran mayores a medida que se alcanzaba el fin de la maduración en los tres viñedos pero en la parcela analizada al año siguiente, la población fue menor en el último muestreo.

Se produjo en todos los casos un aumento en la diversidad de especies presentes a medida que maduraban las uvas, principalmente en Rioja Media, lo que estaría relacionado con el estado de la baya madura: mayor superficie de adhesión y mejor acceso a los nutrientes para los microorganismos. En cualquier caso, el número de especies detectado no fue muy elevado, posiblemente debido al método utilizado para recuperar las levaduras, en el que el tiempo de lavado fue quizá insuficiente. También pudo deberse a la técnica de siembra empleada, sin un paso previo de revitalización, que hubiera permitido recuperar especies que se encontraran en muy bajo número o en estado no cultivable.

En cuanto a las especies identificadas algunas se encontraron en las uvas de las tres zonas estudiadas, como *C. magnus,* y otras, solo en una o dos de ellas, debido probablemente a las diferencias climáticas y a las prácticas culturales de cada viñedo, que determinan en cada baya una carga microbiana específica diferente. En el conjunto de las tres zonas se identificaron siete especies: *C. magnus, M. pulcherrima, K. apiculata, C. stellata*, *A. pullulans*, *R. glutinis* y *C. stellimalicola*.

Cuando en el segundo ensayo con uvas de la zona de Rioja Baja se estudió la importancia cuantitativa de cada especie, se identificaron cinco de las anteriores: *C. magnus, M. pulcherrima, K. apiculata, A. pullulans* y *R. glutinis*. De ellas, *C. magnus*, fue la única detectada en todos los muestreos de los dos ensayos realizados en uvas. Es un género frecuente en las uvas aunque carece de metabolismo fermentativo, como se pudo comprobar en los estudios posteriores sobre las fermentaciones, donde no fue identificada.

K. apiculata tuvo una presencia continua en las uvas, y después en las fermentaciones, realizadas en el estudio posterior. No se observó lo mismo en *C. stellata,* que no fue identificada de forma continua en las uvas, pero después sí estuvo presente de manera importante en las fermentaciones.

Podemos señalar que *R. glutinis* es una levadura poco habitual en ecosistemas vitivinícolas y que, sin embargo, en este trabajo se aisló en uvas de las tres subzonas, aunque en ningún caso en las fermentaciones monitorizadas.

La especie *S. cerevisiae* no fue identificada en las uvas, debido probablemente, a que se encuentre en poblaciones tan bajas que no pueda ser detectada en los muestreos habituales.

De todas estas especies, las encontradas en mayor número fueron *A. pullulans* y *K. apiculata*, seguidas de *C. magnus.* Estas tres constituyeron la mayor parte de la micobiota de las uvas, aunque puede haber una gran variabilidad de unas uvas a otras y de un año a otro, influenciada entre otros factores por las condiciones climáticas. La participación de estas especies en las fermentaciones y/o en la conservación de los vinos dentro de las bodegas fue estudiada posteriormente.

Para analizar la presencia y posible contribución de las levaduras no-*Saccharomyces* procedentes de las uvas en la vinificación se hizo el seguimiento de las fermentaciones

alcohólicas correspondientes a cada una de las parcelas muestreadas en los ensayos anteriores, comprobando así la coincidencia o no de las especies en los dos medios. Las levaduras identificadas a lo largo de las fermentaciones podrían proceder tanto de la uva como del material de bodega, pues las superficies del equipamiento de las bodegas albergan normalmente levaduras vínicas procedentes de campañas de elaboración anteriores. El conocimiento de ese otro medio, las superficies, fue el objeto de estudio de otra parte del trabajo de esta tesis doctoral.

Al estudiar las fermentaciones de las uvas procedentes de las tres subzonas de Rioja del trabajo anterior, se encontró una mayor diversidad de levaduras que en las uvas. El mosto es un medio con gran disponibilidad de nutrientes, lo que favorece el desarrollo de estos microorganismos. Además, hay que tener en cuenta que puede contener especies procedentes del equipamiento de la bodega: despalilladora, estrujadora, bombas, etc. De entre las 17 especies no-*Saccharomyces* identificadas, *C. stellata* y *K. apiculata* fueron las únicas encontradas de forma reiterada en las tres elaboraciones. Otras especies o géneros se encontraron en sucesivos muestreos, pero sólo en una de las elaboraciones estudiadas, como *Pichia* sp, *M. pulcherrima*, *Z. veronae*, *I. orientalis* y *Z. bailii*, todas conocidas por su presencia en mostos y primeras fases de la fermentación, o como levaduras de alteración. La presencia de unas u otras en cada elaboración podría deberse a la micobiota de la uva al proceder de viñedos de distintas zonas o a las características concretas de cada mosto, factores que favorecerían el desarrollo de unas u otras especies.

El resto de levaduras estuvieron presentes de forma esporádica al inicio de las fermentaciones como *T. delbruekii*, *R. rubra, Issatchenkia* sp, *C. sorboxylosa* y *Z. helenicus,* lo que permite deducir su escasa adaptación al medio fermentativo con un grado alcohólico cada vez más elevado.

La mayoría de las especies identificadas en las fermentaciones no habían sido detectadas en las uvas, quizá por encontrarse en poblaciones muy bajas o por no estar presentes en las mismas. En este caso podríamos hablar de un hipotético origen en el contacto del mosto con los materiales y equipos de la bodega.

En las tres elaboraciones, al final de la fermentación sólo se aisló la especie *S. cerevisiae*, más resistente al etanol que el grupo de las no-Sac*charomyces* en general, si bien

algunas especies presentan una resistencia considerable, ya que en la etapa de fermentación tumultuosa, junto a *S. cerevisiae* estuvieron presentes *C. stellata* y *K. apiculata*.

Debemos señalar que en la elaboración con uvas de Rioja Alta, donde la especie *S. cerevisiae* se detectó desde el inicio del encubado, no se identificó ninguna otra especie en la fermentación tumultuosa, quizá debido a la buena adaptación de *S. cerevisiae* al medio fermentativo, lo que haría aumentar rápidamente su población en detrimento del resto de especies.

En cuanto a la presencia en el mosto y durante la fermentación de las levaduras detectadas en las uvas, se observaron diferencias en función de la zona. En el caso de Rioja Alta solo *A. pullulans* se detectó en ambos medios. *M. pulcherrima* y *K. apiculata* se detectaron en Rioja Media, tanto en las uvas como en los primeros días de la fermentación. En Rioja Baja, *K. apiculata* y *C. stellata* presentes en las uvas, también participaron en la fermentación.

En el segundo ensayo, realizado para determinar la importancia cuantitativa de cada especie de levadura en la fermentación realizada con uvas de Rioja Baja, se identificaron siete especies, todas detectadas en el ensayo del año anterior.

Dos de ellas, *C. stellata* y *K. apiculata,* además de *S. cerevisiae*, participaron de forma continua en la fermentación, como ya se había observado de forma general el año anterior y, además, con unas poblaciones importantes, puesto que hasta las 72 horas del encubado supusieron el 80% de todas las levaduras identificadas. Esto sugiere la gran influencia de su metabolismo en las características organolépticas del vino resultante. Su mayor tolerancia a niveles elevados de etanol les permitió estar presentes a las 96 horas en el caso de *K. apiculata* y a las 120 horas en el de *C. stellata*.

Otro grupo de levaduras que se identificó repetidamente en esta fermentación fue el género *Pichia*, principalmente la especie *P. kluyveri*. En las fermentaciones del año anterior también se había detectado este género en fases avanzadas de las mismas y este año se confirmó su importancia cuantitativa en la fermentación espontánea. Asimismo, se identificaron las especies *I. terricola* y *M. pulcherrima* en bajas proporciones. No fueron detectadas en las uvas durante el periodo de maduración, por lo que podrían haberse

encontrado también en las uvas en muy bajo número, o proceder del equipamiento de la bodega.

En este ensayo, S. *cerevisiae* fue identificada en todos los muestreos a partir de las 56 horas desde el encubado, en un principio en proporciones bajas, debido a la competencia del resto de especies, pero de forma mayoritaria a partir de las 96 horas, siendo la única especie presente al finalizar la fermentación alcohólica.

Como hemos visto, la presencia de levaduras no-*Saccharomyces* podría influir de manera importante en las características del vino final, tanto positiva como negativamente, por lo que es necesario el conocimiento de las especies presentes en las fermentaciones espontáneas para poder llevar a cabo un control adecuado del producto final. Además, este conocimiento puede contribuir a la mejora de la calidad de los vinos, lo que se ha puesto de manifiesto actualmente en el desarrollo en estos últimos años de Levaduras Secas Activas del grupo no-*Saccharomyces,* como *P. kluyveri*, *T. delbrueckii* o *C. stellata*, para la inoculación de fermentaciones alcohólicas junto con *S. cerevisiae*.

Estas levaduras pueden proceder de las uvas, pero también de los equipos de las bodegas, por lo que se continuó el trabajo estudiando las especies presentes en las superficies y equipos de cuatro bodegas de la región y en los mostos recién encubados en las mismas. Así, el objetivo fue comprobar qué tipo de levaduras permanece en las bodegas año tras año y si colonizan el mosto en contacto con los equipos.

En las cuatro bodegas estudiadas se observó que entre el 60 y el 70% de las colonias identificadas eran levaduras del grupo no-*Saccharomyces* y el resto correspondía a la especie *S. cerevisiae*. Esto parece indicar la resistencia de este grupo de levaduras a la presión que ejerce *S. cerevisiae,* pues permanecen en el ecosistema de la bodega en mayor porcentaje que esta última en condiciones de no fermentación. La importancia de esta vía de inoculación de los mostos con levaduras no-*Saccharomyces* debería tenerse en cuenta, puesto que algunas de ellas son iniciadoras de las fermentaciones espontáneas.

Dentro de ese grupo de no-*Saccharomyces,* las levaduras no fermentadoras, aunque mayoritarias en las uvas, como *Cryptococcus* spp. y *A. pullulans*, supusieron el 26% de media de todas las colonias. Son, por tanto, capaces de sobrevivir en las superficies, favorecidas por un metabolismo aerobio, a pesar de que no se desarrollan en las fermentaciones.

Pero fue el grupo de las levaduras no-*Saccharomyces* con cierta capacidad fermentadora junto con *S. cerevisiae* las detectadas mayoritariamente en las bodegas. Estas especies que permanecen en la bodega pueden desarrollarse en los depósitos en fermentación de la misma manera que ocurre con la especie *S. cerevisiae*, que, como hemos visto en los anteriores trabajos, no fue identificada en las uvas estudiadas en ningún caso, lo que sugiere que su origen se encuentra en los materiales de la bodega en contacto con el mosto. Por lo tanto, esto debería tenerse en cuenta debido a la influencia de este grupo de levaduras en las características del vino final si se demuestra que participan en la vinificación. Así, es importante conocer su procedencia, su permanencia en la bodega, sus modos de diseminación de unas zonas a otras o de unos medios a otros (uvas, mostos, superficies) y, también, cuáles son las condiciones para que se mantenga esa población en esos equipos y cómo puede afectar a ello el grado de limpieza de los mismos o el método empleado para realizarla.

En el estudio se identificaron 18 tipos de levaduras, correspondientes a distintos géneros y especies. De entre todos ellos, los géneros *Pichia* y *Cryptococcus* y la especie *P. anomala* fueron detectados en las cuatro bodegas. *T. delbruekii* y *P. membranaefaciens* se detectaron en tres bodegas. *A. pullulans*, *K. apiculata* y *D. hansenii* se aislaron en dos bodegas y las levaduras restantes solo en una bodega. A pesar de esas diferencias en la composición de las poblaciones en las tres primeras bodegas, atribuibles al "efecto bodega", es decir, a la aclimatación por parte de las levaduras a un determinado ecosistema, el tamaño y la distribución de las poblaciones fueron similares. Las mayores diferencias se encontraron en la Bodega 4, lo que podría ser debido al método de limpieza utilizado en los equipos, que influiría de manera importante en el grado de eliminación de levaduras presentes en esas superficies. En esta bodega, donde se utilizó una solución acuosa de metabisulfito potásico en circulación por las instalaciones sin posterior aclarado, solo se aislaron levaduras en cuatro de los diez lugares analizados, y únicamente se identificaron cuatro especies diferentes, con una mayoritaria, *P. membranaefaciens*. Es en esta bodega también donde se encontró el mayor porcentaje de *S. cerevisiae* (40%), quizás porque esta levadura es más resistente al sulfuroso empleado en la limpieza que el grupo no-*Saccharomyces*. En las otras tres bodegas, con una limpieza a base de solución acuosa de hidróxido de sodio y posterior aclarado con agua, en prácticamente todos los puntos muestreados se detectaron levaduras y ninguna especie era mayoritaria entre las nueve identificadas de media en cada bodega. Parece, por tanto, que el

primer método de limpieza resultó más eficaz en la eliminación de levaduras presentes en los equipos.

Al comparar las especies identificadas en las superficies con las de los mostos encubados no pudimos deducir claramente que el origen de estas últimas estuviera en el contacto con los equipos. Así, la especie *Z. veronae* fue la mayoritaria en el mosto de la bodega 1, y solo en esa bodega se detectó en las instalaciones, pero no ocurrió lo mismo en las otras tres bodegas, donde *Candida* sp y *K. apiculata*, que suponían el 100% de las levaduras presentes en los mostos a las 24 horas, apenas habían sido detectadas en los equipos. Por ello, no se justifica que la inoculación de los mostos con esas especies no-*Saccharomyces* se produjera a través del contacto con las superficies de las bodegas. La presencia y el desarrollo de las levaduras durante la fermentación alcohólica dependerán, además, de otros factores como son la interacción entre ellas, la composición de los mostos y la capacidad de adaptación de cada una a las condiciones fermentativas.

La permanencia de levaduras en las superficies de los equipos de la bodega puede suponer asimismo una fuente de agentes contaminantes. En este ensayo, algunas levaduras de contaminación detectadas, como *Rhodotorula* spp., *Cryptococcus* spp., *D. hansenii* o *A. pullulans,* difícilmente podrían generar un problema de alteración en los vinos debido a su metabolismo aeróbico. Otras, como *P. membranaefaciens*, *P. anomala* y *Candida* spp. podrían contaminar los vinos formando velos en su superficie, pero únicamente en unas condiciones concretas con vinos expuestos al aire y bajos niveles de sulfuroso. Sí es más preocupante la presencia de *Z. bailii* en las superficies y el mosto de la bodega 1. Esta levadura es causante de refermentaciones en vinos terminados, en los que produce altos niveles de acidez volátil, pues es muy resistente al anhídrido sulfuroso. Es capaz de permanecer en el equipamiento entre una campaña y otra y contaminar las nuevas elaboraciones, alterando los vinos resultantes.

Tras el estudio de las levaduras no-*Saccharomyces* en uvas, medio fermentativo y materiales de las bodegas, como lugares de origen, medios de desarrollo y reservorios de estos microorganismos, se consideró necesario estudiar el aire dentro de las bodegas como posible vehículo de transmisión de los mismos. Es un medio bien conocido en otras industrias agroalimentarias, pero apenas estudiado en la industria enológica.

Para conocer mejor la presencia de levaduras en el aire y si este puede ser una vía de diseminación de las levaduras presentes en las uvas, mostos y equipos de las bodegas se tomaron muestras de aire de distintas zonas de una bodega a lo largo de dos años, y se completó con el estudio de otras dos bodegas a lo largo de un año. Así, se determinó qué especies estaban presentes en el aire de las distintas zonas de estas instalaciones, la influencia de distintos factores en su diseminación, y si las especies encontradas podrían suponer un riesgo para la elaboración, la crianza y el almacenamiento de los vinos en las mismas.

El paso al aire de las levaduras presentes en las superficies podría ser uno de los mecanismos de transmisión previos a la colonización por parte de esos microorganismos de los mostos en fermentación o de los vinos, puesto que, como hemos visto, las superficies de los equipos son un reservorio de especies indígenas, lo que da lugar a una especificidad microbiológica de cada bodega. Pero el aire también podría suponer una fuente de alteraciones por parte de especies con características enológicas negativas.

En el primero de nuestros ensayos, realizado en una bodega, las poblaciones de levaduras en el aire siempre fueron muy bajas en todas las zonas, inferiores a 20 NMP/m^3, y variaciones en factores como la temperatura o la humedad no influyeron de forma general en el número de levaduras ni en los géneros encontrados en el aire en ninguna de las zonas.

Solo el comienzo de las fermentaciones alcohólicas dio lugar a un gran incremento de levaduras en el aire de la zona de elaboración, fundamentalmente de la especie *S. cerevisiae,* por lo que se pudo atribuir este aumento a las levaduras procedentes de los depósitos en fermentación. Además, en esta bodega se detectó en el mismo período una mayor población de levaduras en el aire de la zona de embotellado, comunicada con la de elaboración. Este hecho sugiere que estos microorganismos procederían de esos depósitos: las levaduras se habrían dispersado por el aire, procedentes de la zona de elaboración, pues la especie *S. cerevisiae* se detectó en la zona de embotellado exclusivamente ese mes. Si esta especie procediera del vino que se estaba embotellando, su presencia se habría detectado en alguno de los restantes muestreos.

Otro hecho que parecía confirmar que el número de levaduras en el aire estaba relacionado con el grado de actividad llevada a cabo fueron los mayores recuentos poblacionales registrados en la embotelladora a lo largo de todo el año en comparación con los registrados en las otras zonas de la bodega. En esta zona, a diferencia del resto, donde la

actividad es esporádica, se trabajaba a diario: todos los días se embotellaba vino, lo que implica la manipulación de productos y maquinaria que pueden contener levaduras que pasan al aire.

Todas las especies identificadas son muy comunes en diversas industrias alimentarias, aunque en bajos niveles. La mayoría de las levaduras aisladas en el aire de la bodega fueron especies o géneros incapaces de contaminar o desarrollarse en los vinos, o con muy poca capacidad para ello, y que no suelen aparecer en las fermentaciones como *Cryptococcus, Aureobasidium, Sporidiobolus, Sporobolomyces, Williopsis* o *Bullera*. Pero también se identificaron géneros con cierta capacidad de desarrollo en depósitos en fermentación o durante el almacenamiento de los vinos, como *Candida, Pichia, Debaryomyces* o *Rhodotorula*. Estas levaduras, como vimos ya en el estudio de los equipos, pueden dar problemas de contaminaciones cuando hay residuos de vino en las superficies o una deficiente protección de los vinos frente al oxígeno.

Las principales levaduras que pueden producir alteraciones en los vinos como *Z. bailii*, *S. ludwigii* o *B. bruxellensis* no fueron detectadas en el aire de esta bodega, a pesar de que en este trabajo se utilizó el medio DBDM, selectivo para *Dekkera/Brettanomyces*.

En general, las levaduras identificadas en el aire de las cuatro zonas estudiadas fueron especies o géneros que por sus características son muy resistentes a condiciones de estrés térmico, hídrico, lumínico y nutricional y que son habituales en ecosistemas como las instalaciones de las bodegas y también en el aire. Son levaduras esporuladas o levaduras con metabolismo oxidativo, o bien, productoras de mucílago, como *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* y *Cryptococcus*, lo que permite una mayor adhesión a las superficies y una mayor protección frente a las condiciones de estrés térmico, de desecación y de irradiación.

De todas ellas, las levaduras presentes en todos los muestreos en el aire de las cuatro zonas a lo largo del año pertenecían a los géneros *Cryptococcus* y *Sporidiobolus* y fueron, además, las mayoritarias en las diferentes zonas.

Al estudiar cada zona a lo largo del año, se observó que algunas especies aparecían con mayor frecuencia en determinadas zonas. Así, en la nave de barricas hubo una mayor presencia de los géneros *Debaryomyces* y *Sporobolomyces* y en el botellero de los géneros *Candida* y *Sporidiobolus*, este último asociado a los corchos, lo que justificaría su mayor

presencia en esa nave. En la embotelladora se encontraron tres géneros exclusivos de esta zona: *Williopsis, Bullera* y *Torulaspora*. Los dos primeros no son géneros habituales en uvas, vinos y bodegas, por lo que la explicación para su presencia continuada en esa zona sería que procedieran de algún material auxiliar empleado exclusivamente en la embotelladora, como el agua de lavado, botellas, corchos, cajas de cartón, etc.

De las cuatro zonas analizadas, la mayor presencia de levaduras se encontró en la embotelladora, tanto en número como en diversidad, con doce géneros diferentes. Esta circunstancia la convierte en la zona de mayor riesgo de contaminación del vino a partir del aire, contaminación que se produciría además en el momento en que los vinos van a ser puestos en el mercado.

Dentro de los géneros identificados, la mayor diversidad se encontró dentro del género *Cryptococcus*, del que se aislaron once especies distintas, seguido del género *Candida* con cinco especies, *Pichia* con cuatro y *Rhodotorula* con dos.

Para conocer de forma más general el aire de las bodegas como medio de dispersión de levaduras, del riesgo de contaminaciones y de la necesidad de efectuar controles microbianos del aire e incluso la purificación del mismo, se continuó el trabajo un año más en la misma bodega (Bodega 3 en el artículo publicado) y ampliando el estudio a otras dos bodegas (Bodegas 1 y 2) para establecer las variaciones en las poblaciones de levaduras en el aire en función de diferentes factores como la edad, el diseño o la capacidad de la bodega.

En cuanto al tamaño de las poblaciones de levaduras en el aire se obtuvieron valores inferiores a 20 NMP/m^3 en las cuatro zonas de las tres bodegas durante la mayor parte del año, similar a lo detectado el año anterior en la bodega estudiada. Se observó de nuevo que la actividad desarrollada en cada zona fue el factor que influyó en el número de levaduras presentes en el aire. Así, en las naves de elaboración de todas las bodegas se apreció un gran incremento en la población mientras tenían lugar las fermentaciones alcohólicas, lo que confirma los resultados obtenidos el año anterior, cuando se observó claramente la relación existente entre el número de microorganismos y la presencia de *S. cerevisiae* en el aire, con la actividad fermentativa en los depósitos.

A pesar de las similitudes, se apreciaron algunas diferencias en zonas concretas. Así, en la nave de barricas de la Bodega 2 los recuentos medios fueron más elevados que en el

resto de las zonas y que en las naves de barricas de las otras bodegas. Este hecho podría tener su explicación en el diseño de la bodega, en la que, a diferencia del resto de bodegas, esta nave dispone de una zona abierta a la calle, con mayores corrientes de aire desde el exterior, que movilizan mayor cantidad de microorganismos que en naves soterradas y aisladas del exterior. Los recuentos máximos se recogieron en los muestreos realizados cuando se estaba realizando algún trasiego, en invierno y verano, al movilizar los vinos y el equipamiento de la bodega, que albergan microorganismos que son liberados al aire con la actividad.

También en la embotelladora de la Bodega 1 se registraron mayores recuentos en los momentos en que se estaba embotellando, en invierno y primavera, y en la de la Bodega 3 una población mayor de forma continuada, puesto que la embotelladora estaba en funcionamiento en todos los muestreos. En la de la Bodega 2, sin embargo, los recuentos fueron muy bajos, coincidiendo con una ausencia de actividad en la zona.

Todos estos datos, junto con los obtenidos en el ensayo anterior, ponen de manifiesto que cuando se realizan acciones que implican la manipulación de diversos productos que portan levaduras y que pueden ser liberadas al aire las poblaciones encontradas en este medio son mayores.

Por tanto, como ya se dedujo en el ensayo anterior, debido a la mayor actividad llevada a cabo en la zona de la embotelladora, esta sería el área que necesita una mayor vigilancia debido al número de levaduras transportadas por el aire y a que es la última fuente de una posible contaminación del vino antes de ponerlo en el mercado.

Al estudiar la diversidad específica de las poblaciones del aire no se identificaron especies distintas a las ya identificadas en el ensayo en la Bodega 3, por lo que las diferencias en distribución, edad, ubicación o tamaño de las bodegas no influyeron de manera significativa ni en el tamaño de las poblaciones ni en la distribución por especies. Podríamos hablar de unas levaduras propias de los ambientes vinícolas en general que pueden encontrarse en el aire, con ligeras diferencias de unas bodegas a otras. Estas diferencias, con especies más habituales en una bodega que en las otras, podrían atribuirse al "efecto bodega". Sería el caso de la mayor presencia de *Sporidiobolus* en la Bodega 3, que ya se observó en el ensayo anterior, la presencia exclusiva de *Williopsis* en la misma durante los dos años estudiados, o la mayor presencia del género *Pichia* en la Bodega 1.

Otras levaduras fueron identificadas en las tres bodegas de forma similar. Así, el género *Cryptococcus* estuvo de nuevo presente de forma continua en el aire de las tres bodegas a lo largo del año y fue el mayoritario, además de presentar otra vez la mayor variabilidad específica, con cinco especies distintas. El otro género identificado a lo largo del año en las tres bodegas fue *Aureobasidium*.

Al comprobarse que el embotellado de los vinos es un punto crítico por la mayor población de levaduras en el aire de la zona cuando hay actividad y ser el último paso antes de poner el vino en el mercado era importante analizar el riesgo de una contaminación estudiando la naturaleza de las levaduras detectadas. Los géneros presentes de forma continua en el aire de la zona de embotellado de las tres bodegas a lo largo del año fueron *Cryptococcus*, *Sporidiobolus* y *Rhodotorula*, siendo este último exclusivo del aire de esta zona. Además, el género *Sporidiobolus*, frecuente en corchos, fue más abundante en esta zona que en el resto, al igual que ocurrió el año anterior en la Bodega 3.

En la embotelladora de la Bodega 3 se identificaron, como en el ensayo anterior, *Pichia*, *Williopsis* y *Saccharomyces*, y sólo en esta bodega, lo que nos lleva una vez más a pensar en ese "efecto bodega". El género *Saccharomyces* solo se detectó, exceptuando las naves de elaboración, en esta embotelladora, demostrando de nuevo esa transmisión a través del aire desde la nave de elaboración anexa en la época de vinificación. La mayoría de las levaduras detectadas en el aire de la zona de la embotelladora no tenían capacidad para desarrollarse en el vino, por la ausencia de metabolismo fermentativo, a excepción de *Pichia* y *Saccharomyces,* en la Bodega 3. Así, con unas condiciones adecuadas de higiene y conservación de los vinos durante el embotellado no existe riesgo de alteración, aunque el nivel de levaduras en el aire sea mayor que en otras zonas de la bodega.

Sin embargo, en la nave de barricas, a diferencia del ensayo anterior, se detectó la presencia de la especie *B. bruxellensis* en algunos de los muestreos, lo que puso de manifiesto el riesgo que supone la manipulación de vinos contaminados y cómo la detección a través del aire puede ser un método adecuado de control.

Para detectar esta especie se utilizó el medio DBDM, muy restrictivo, en el que se desarrollan pocas levaduras puesto que está diseñado para el aislamiento de esa especie en concreto. Por ello, los recuentos, eran inferiores a 2 NMP/m^3, siendo cero en muchos de ellos, a excepción de dos momentos en que se detectaron 5 y 18 NMP/m^3 en las Bodegas 2 y 3

respectivamente. Las colonias identificadas, 109 en total, correspondían a 10 especies distintas. Entre ellas se detectó *B. bruxellensis* en la nave de barricas de la Bodega 3 en verano. Al analizar la actividad llevada a cabo en ese momento en la bodega, se comprobó que se estaban llenando barricas con una partida de vino procedente de otra bodega que, tras ser analizado, reveló que contenía un alto nivel de levaduras de esta especie. Esto, junto con el hecho de no haber detectado *B. bruxellensis* en la misma bodega el año anterior, confirmó una vez más la influencia de la actividad de la bodega en la presencia de levaduras en el aire a partir de la liberación de las mismas desde los vinos y, en particular, demuestra su importante diseminación por el aire al manipular productos cargados de microorganismos. También permitió afirmar que esta levadura de alteración puede ser transportada por el aire de las bodegas hasta su depósito sobre superficies, materiales u otros vinos y que su detección en muestreos de aire convierte este análisis microbiológico en un método de control.

A modo de resumen, y tras comprobar cómo a lo largo del trabajo se identificaron un gran número de géneros y especies de levaduras en los distintos ecosistemas, podemos realizar una visión general de algunas de ellas que merecen ser destacadas por su número, su presencia en todos ellos o su importancia como participantes en las elaboraciones o como posibles agentes de contaminación y alteración de los vinos.

Si comenzamos por las especies que tienen una mayor participación en las fermentaciones alcohólicas espontáneas dentro del grupo no-*Saccharomyces* debemos hablar de *K. apiculata* y *C. stellata*.

K. apiculata fue identificada en la superficie de las uvas en las zonas de Rioja Media y Baja, en varios de los muestreos, y en número elevado en el ensayo cuantitativo en Rioja Baja. También fue identificada de forma continua en prácticamente todos los muestreos realizados en las fermentaciones alcohólicas realizadas con las uvas de las tres subzonas de la Denominación, desde el momento del encubado, hasta, como mínimo, las 48 horas. En una de esas fermentaciones seguía presente en el momento de fermentación tumultuosa y en el ensayo cuantitativo se comprobó que su población era superior al 40% del total de levaduras hasta las 72 horas. En esta fermentación con uvas de Rioja Baja llevada a cabo el segundo año, fue la especie mayoritaria junto a *C. stellata*, donde entre las dos suponían al menos el 80% de todas las levaduras hasta las 72 horas.

Esta especie formaba parte de las levaduras identificadas en las superficies de los equipos en dos de las cuatro bodegas, así como en los mostos encubados en tres de ellas tras entrar en contacto con esos equipos. Sin embargo, en este caso hay que señalar que en las dos bodegas en las que no fue detectada en las superficies supuso el 100% de las levaduras detectadas en los mostos. Así, parece que en esos casos su origen estuvo en las uvas, aunque también es capaz de permanecer en las bodegas formando parte de ese ecosistema.

En los ensayos realizados con el aire de tres bodegas, fue identificada únicamente en dos zonas de la Bodega 3 en el segundo año, en la zona de barricas y en la nave de elaboración. En el primer año, en esa misma bodega, no se encontró esta especie a pesar del gran número de colonias analizadas. Su presencia en esa zona de elaboración se debería probablemente a que es la zona en la que están la uva y el mosto en fermentación y liberan al aire las especies más comunes en ese proceso, como parece que es *K. apiculata*. En cualquier caso, en esas bodegas las fermentaciones alcohólicas se realizan con adición de Levaduras Secas Activas, lo que dificulta el desarrollo de especies indígenas debido a la gran población de *S. cerevisiae* inoculada.

En conjunto, se pudo observar que *K. apiculata* presentaba una cierta continuidad en todos los ecosistemas estudiados. Si bien con los resultados de este trabajo no es posible concluir una procedencia clara de esta especie, parece que su presencia en las uvas y sus características metabólicas le permiten conquistar el medio fermentativo con facilidad.

Otra especie a destacar es *C. stellata*. En los ensayos realizados con uvas fue detectada únicamente el primer año en la zona de Rioja Baja. Pero fue identificada en las cuatro fermentaciones alcohólicas, y además de forma importante, puesto que en dos de las fermentaciones del primer año, las de Rioja Media y Rioja Baja, apareció de forma continua desde el encubado hasta la fermentación tumultuosa. En la elaboración del segundo año, realizada con uva de Rioja Baja, a pesar de no ser haber sido detectada en esas uvas, fue la levadura mayoritaria en el encubado, suponiendo el 60% del total y siguió presente hasta la fermentación tumultuosa con poblaciones elevadas. Ya se ha comentado que supuso junto a *K. apiculata* el 80% del total de levaduras de esa elaboración hasta las 72 horas. Así, algunas especies pueden conquistar el medio en fermentación gracias a su capacidad de adaptación al mismo, aunque estén en las uvas en menor número que otras especies.

Otra causa de esa gran proporción de la especie *C. stellata* en las fermentaciones podría ser su presencia en el equipamiento de la bodega. En esos ensayos no se estudiaron esos equipos, por lo que no podemos deducir su origen. Pero en los ensayos posteriores esta especie no fue identificada en los equipos de las bodegas ni en los mostos en contacto con esas superficies. Tampoco fue identificada en ningún muestreo en el aire de las bodegas estudiadas, aunque se identificaron también otras especies dentro del mismo género. Así, no podemos deducir de dónde procedía esta levadura, pero no parece muy habitual del ecosistema de bodega, al menos en los casos estudiados.

Otros géneros y especies resultaron de interés en este trabajo por su persistencia en distintos ecosistemas. Es el caso del género *Cryptococcus* o la especie *A. pullulans*. *Cryptococcus* es un género presente en todos los ecosistemas estudiados, a excepción de las fermentaciones alcohólicas y de los mostos encubados. Dentro de este género, la especie *C. magnus* fue identificada de forma importante en las uvas estudiadas de las tres regiones de la Denominación, estando presente en todos los muestreos excepto en uno del segundo año. Sin embargo, a pesar de ser una de las especies mayoritarias en el último muestreo del estudio cuantitativo, no se detectó en ningún momento durante la fermentación alcohólica realizada con esas uvas, ni con las del ensayo cualitativo, poniendo de manifiesto su carácter claramente oxidativo y muy sensible a las condiciones de vinificación.

Pero ello, no es impedimento para que este género, así como otras levaduras no fermentadoras, sean capaces de sobrevivir en el ecosistema de la bodega. Los géneros *Cryptococcus* y *Pichia* fueron los únicos identificados en los equipos de las cuatro bodegas del estudio, pero no fueron detectados en los mostos encubados.

La presencia de *Cryptococcus* en distintos ambientes aerobios fue tan importante que era muy probable que fuera movilizado por el aire en las bodegas. De hecho, se identificó a lo largo de todo el año en el primer ensayo realizado con el aire, suponiendo alrededor del 30% de las levaduras presentes en este medio, lo que significa una proporción importante de este género, ya que se identificaron 12 géneros en total. En el segundo ensayo en el aire volvió a ser el mayoritario prácticamente en las tres bodegas y con una presencia continua de nuevo a lo largo de todo el año, sobre todo en la Bodega 1, donde supuso el 73% de todas las levaduras analizadas. Las líneas de embotellado de las tres bodegas presentaban una población permanente de tres géneros, unos de los cuales era *Cryptococcus*.

Es evidentemente, un género ubicuo, que forma parte de la micobiota de la superficie de las uvas y que permanece en las bodegas y es transportado por el aire, aunque no es capaz de colonizar el medio fermentativo.

La especie *A. pullulans* también fue identificada en todos los ecosistemas, aunque su presencia no fue tan continua como la de *Cryptococcus*. En las uvas fue detectada en Rioja Alta y Media el primer año, y en todos los muestreos en Rioja Baja en el segundo, con una proporción del 76% de la población 12 días antes de la vendimia, y del 44% un día antes de la vendimia. Sin embargo, esa importante presencia en las uvas no le permitió adaptarse al medio fermentativo, donde no fue identificada. Solamente se detectó su presencia en el mosto recién encubado del estudio cualitativo de las zonas de Rioja Alta y Baja.

Se observó que esta especie formaba parte de las levaduras que permanecen en las superficies y el equipamiento de las bodegas, al menos en dos de las cuatro estudiadas. Y se comprobó, como en los ensayos anteriores, su escasa adaptación al mosto en fermentación, puesto que a las 24 horas del encubado ya no estaba presente en ninguno de los mostos analizados.

En el ensayo llevado a cabo en el aire de una bodega el género *Aureobasidium* fue el tercero más frecuente en el conjunto de sus zonas a lo largo del año. Y en el ensayo realizado al año siguiente estuvo entre los tres géneros más frecuentes en las tres bodegas estudiadas y, junto con *Cryptococcus*, fue el que se identificó con más continuidad a lo largo de todo el año. Se puede afirmar, por tanto, que es otra levadura de carácter oxidativo, presente en todos los ecosistemas vitivinícolas, que se dispersa también por el aire, y que se detecta incluso en el encubado de los mostos, aunque no participa de forma activa en la fermentación alcohólica.

Otros géneros y especies también están presentes en varios de los ecosistemas estudiados, aunque no de forma tan continua. Es el caso de *M. pulcherrima*, conocida como una levadura frecuente en uvas y en las primeras fases de la fermentación alcohólica, que fue identificada en los muestreos en las uvas de Rioja Media y en el último del ensayo cuantitativo en Rioja Baja. Se identificó puntualmente en todas las fermentaciones, excepto en la de Rioja Media, en la que estuvo presente de forma continua hasta las 48 horas del encubado. Quizá una mayor población en esas uvas le permitió ser más competitiva en el medio fermentativo. También se detectó en las superficies de una de las bodegas estudiadas, aunque de forma minoritaria, y no se identificó en el mosto encubado. Parece que se trata de

una levadura presente en todos los ecosistemas vitivinícolas, adaptada a ellos, aunque no de una forma mayoritaria. Sus pequeñas poblaciones en estos ecosistemas pudieron ser la causa de que no fuera identificada en el aire de ninguna de las bodegas.

El género *Rhodotorula* estuvo también presente de forma puntual en varios de los ecosistemas. La especie *R. glutinis* fue identificada en alguno de los muestreos en las uvas de las tres zonas de la Denominación, aunque no se observó su presencia en ninguna de las fermentaciones. Sin embargo, sí formaba parte de las levaduras presentes en el equipamiento de una de las cuatro bodegas estudiadas, con un 14% de las identificaciones. En el estudio del aire de las bodegas este género fue detectado principalmente en la embotelladora y en la nave de barricas de la bodega estudiada el primer año y, únicamente en las tres embotelladoras el segundo año. Quizá su origen fuera el material auxiliar utilizado en esas naves, puesto que no parece tener mucha presencia en el medio fermentativo.

El género *Pichia* no se identificó en los muestreos realizados en las uvas, pero sí en las fermentaciones. Este género presentó una considerable resistencia al grado alcohólico pues fue detectada en la elaboración realizada con uvas de Rioja Alta de forma continua hasta las 48 horas del encubado y en la segunda elaboración de Rioja Baja estaba presente a las 72 horas. Es un género persistente en los ecosistemas vinícolas, pues se detectó en los equipos de las cuatro bodegas estudiadas, y en una proporción importante en la Bodega 4. En cuanto a su dispersión por el aire, fue identificada en las cuatro zonas de la bodega del primer ensayo, sobre todo en el aire de las zonas de elaboración y de embotellado, y en las naves de barricas y elaboración de la Bodega 1 al año siguiente.

Aunque ya comentamos la presencia de *C. stellata*, podemos fijarnos en el género *Candida*, que fue identificado en varios de los ecosistemas estudiados. Así, fue detectado en las uvas de las regiones de Rioja Media y Baja y puntualmente en las fermentaciones de Rioja Alta y Baja. Algunas especies de este género estaban presentes en los equipamientos de las Bodegas 2 y 3 del estudio de las superficies. Y hay que destacar que el 100% de las levaduras identificadas en el mosto de la Bodega 4 pertenecían a este género, por lo que probablemente procediera de las uvas y no del equipamiento de la bodega. Este género se detectó también en el aire de dos de las tres bodegas estudiadas, en mayor proporción en las zonas de crianza en barrica y crianza en botella, zonas en principio, con menor actividad humana a lo largo del año.

Otra especie detectada en varios de los ecosistemas fue *T. delbrueckii*. No es una de las especies principales pero aparece normalmente en ambientes vinícolas. En este trabajo se aisló en las fermentaciones de manera puntual, fue identificada en los equipos de tres de las cuatro bodegas del estudio de las superficies, en una de las cuales fue la levadura más frecuente, y en el aire apareció puntualmente en la zona de elaboración y de embotellado. Esta presencia en todos los ecosistemas, aunque no de forma muy importante, demuestra su adaptación a los ambientes enológicos, lo que actualmente se ha utilizado en beneficio de la industria enológica, Así, es una de las especies no-*Saccharomyces* comercializadas para la coinoculación de fermentaciones alcohólicas controladas, puesto que mejora el perfil aromático de los vinos.

Podríamos destacar por su reiterada presencia el género *Sporidiobolus* como el segundo mayoritario en el aire de la bodega estudiada durante dos años. Un género que no es detectado en otros ecosistemas del estudio pero que parece tener una gran persistencia en ese ambiente siendo parte importante de su micobiota habitual.

En cuanto al riesgo de alteración de los vinos que pueden suponer las especies o géneros encontrados podemos destacar dos casos. El género *Zygosaccharomyces*, con especies con capacidad para contaminar los vinos y provocar alteraciones indeseables en los mismos, como *Z. bailii*, no fue identificado en todos los ecosistemas, pero estuvo presente de forma continua en las fermentaciones estudiadas en las tres zonas de la Denominación, sin haber sido detectada previamente en las uvas de procedencia de esas elaboraciones. Esto podría hacer pensar que su origen estaba en el material de la bodega, lo que estaría apoyado por lo ocurrido en el estudio de los equipamientos de las bodegas, donde fue detectado en una de ellas y en el mosto encubado en la misma. Así, y debido al riesgo que supone la presencia de este género, deberían tomarse mayores medidas de seguridad para evitar su permanencia en las instalaciones de las bodegas.

La especie *B. bruxellensis*, otra especie preocupante por su capacidad de contaminación y alteración de los vinos durante su almacenamiento en las bodegas, únicamente fue detectada en el aire de la zona de barricas de una de las bodegas. Fue necesario el empleo de un medio de cultivo y unas condiciones de recolección y de incubación adecuadas para esta especie, pero quedó de manifiesto que es posible detectarla en aire cuando se produce la manipulación de un vino contaminado con la misma.

Debido a la escasa bibliografía existente sobre las levaduras presentes en el aire de las bodegas, como última parte de este trabajo, se estudió la capacidad de tres medios de cultivo diferentes para la recuperación de las levaduras del aire, utilizando los datos obtenidos durante los dos años de ensayos. Esto sirvió para tratar de estandarizar un método eficaz para el estudio de las levaduras movilizadas por el aire en los ecosistemas vinícolas.

Los medios de cultivo fueron CGA, AL y DBDM. Los dos primeros se utilizaron para el aislamiento de levaduras en general, con la diferencia de que el AL impide, en principio, el crecimiento de levaduras del género *Saccharomyces*. El medio DBDM se utilizó para la recuperación de levaduras del género *Brettanomyces/Dekkera*, y su empleo fue precedido de una fase de revitalización de la muestra en medio MR.

De todos los muestreos realizados en las bodegas, en el 33% de ellos no se recuperó ninguna colonia, y en el resto los recuentos fueron muy bajos, en muchos casos inferiores a 10 colonias por placa. Esto se debió, probablemente, a la escasa actividad llevada a cabo en la zona muestreada. De hecho, el mayor número de aislamientos coincidió, en todos los casos, con los muestreos realizados en las áreas de vinificación en la época de elaboración del vino, cuando hay una mayor actividad y manipulación de productos que albergan levaduras.

El mayor número de aislamientos se produjo en el medio CGA, un 54 % del total. En el medio AL se aisló el 40 % del total de colonias y en el medio DBDM solo se aisló el 6 %. Los aislamientos en este último medio fueron muy bajos a pesar de que el volumen de aire muestreado fue tres veces superior al recogido en los otros dos y de que se realizó la etapa previa de revitalización en MR, pero su selectividad dificultó el crecimiento de la mayoría de las especies. Los escasos aislamientos se produjeron principalmente en la nave de barricas y en la embotelladora.

A pesar de ello, en una de las muestras tomada en la Bodega 3 con los medios MR y DBDM, se recogieron 52 colonias, pertenecientes a la especie *B. bruxellensis*, en un momento en que se estaba realizando un trasiego en la nave de barricas de un vino procedente de otra bodega contaminado con esta especie, lo que apoya la hipótesis de que la manipulación de líquidos que contienen levaduras facilita la proyección de las mismas hacia el aire y que por esta vía pueden llegar a otras zonas de la bodega. Únicamente el medio DBDM fue capaz de permitir el crecimiento de *B. bruxellensis* puesto que las levaduras que se aislaron en ese mismo muestreo en CGA y AL no pertenecían a esa especie. Al trabajar con el medio DBDM

se cubren completamente los complejos requerimientos nutricionales de esta especie, y se realiza un largo tiempo de incubación, necesario para el desarrollo de esta levadura de lento crecimiento.

Al considerar la diversidad detectada con cada medio de cultivo se observó que en CGA se aislaron 12 de los 17 géneros identificados en el conjunto del estudio. En el medio AL se identificaron 14 y el medio DBDM fue el que presentó mayor especificidad, con solo 10 géneros distintos.

En conjunto, se identificaron 44 especies distintas en los tres medios evaluados. En el medio CGA creció el 61% de las especies, de las cuales el 11% solo fueron aisladas en este medio. En el medio AL se pudo aislar el mayor número de especies distintas, el 77% del total, y, además, el 25% de ellas creció solamente en este medio. En el medio DBDM se detectó el 25% de las especies, una de las cuales era *B. bruxellensis*.

Por tanto, pudimos comprobar cómo tanto CGA como AL fueron adecuados para recuperar las levaduras presentes en el aire sin necesidad de una etapa previa de revitalización, con ligeras diferencias entre ellos: CGA recuperó un número ligeramente mayor de levaduras que el medio AL, pero este último permitió el crecimiento de mayor diversidad de géneros y especies. Por tanto, según cuál sea el objetivo de cada estudio, sería más recomendable el uso de uno u otro medio: CGA para estimar el tamaño de una población de levaduras en general en el aire y AL para profundizar en la diversidad de esa población. Por otro lado, en AL se aisló la especie *S.cerevisiae*, a pesar de que se suponía la incapacidad de esta especie para crecer en un medio cuya única fuente de nitrógeno es el aminoácido lisina.

A pesar de esa recuperación de numerosos géneros y especies, ni CGA ni AL se mostraron adecuados para aislar levaduras del género *Brettanomyces*. El medio DBDM es el único que proporciona la especificidad suficiente para su recogida e identificación desde el aire, si bien sus especiales características hacen necesario un protocolo de revitalización previo al empleo de un medio tan específico como es el caso de DBDM.

De forma general, en este trabajo se puede concluir que hay una continuidad entre los distintos ecosistemas vitivinícolas, en los que especies que habitan en las uvas lo hacen también en el ecosistema de la bodega, aunque no hayan participado en las fermentaciones alcohólicas. Existe un intercambio de levaduras entre los distintos medios y parece ser llevado a cabo, entre otros agentes, por el aire, que moviliza estos microorganismos desde depósitos en fermentación, recipientes para la crianza o almacenamiento del vino o equipos o maquinaria de la bodega, hacia otras zonas de la misma.

No está claro el origen de las levaduras implicadas en la vinificación, ya que hay levaduras que son detectadas en proporciones importantes en las uvas y en el mosto en fermentación, pero también hay otras que no son encontradas en las uvas y sin embargo tienen una presencia relevante a lo largo del proceso fermentativo. Esto lleva a pensar que no es tan determinante el tamaño de la población de cada especie en las uvas, en el material de la bodega o en el aire, como la capacidad de adaptación de las levaduras al medio fermentativo, que les lleva a imponerse en el mismo, como el caso de *C. stellata*, o a desaparecer rápidamente, como *C. magnus* o *A. pullulans*.

6. Conclusiones

1. Los recuentos de levaduras en las uvas al final del periodo de maduración fueron siempre del orden de 10^3-10^4 UFC/baya, y la diversidad específica aumentó con la maduración de las uvas.

2. Se detectaron siete especies de levaduras diferentes en todas las muestras de uva estudiadas y, de ellas, las especies mayoritarias fueron *Kloeckera apiculata*, *Cryptococcus magnus* y *Aureobasidium pullulans*.

3. La diversidad de levaduras en los mostos en fermentación fue considerable. Se encontraron 17 especies distintas en el conjunto de las elaboraciones estudiadas.

4. Las especies, *Candida stellata* y *Kloeckera apiculata* fueron detectadas en todas las elaboraciones de manera continua y en proporciones elevadas hasta las 72 h de la fermentación alcohólica, suponiendo hasta ese momento el 80% de la población, de ahí el importante papel que estas levaduras pueden tener en las características del vino.

5. La presencia de *Saccharomyces cerevisiae* en el mosto, su mejor adaptación y mejor competencia por los recursos del medio, condicionaron la supervivencia de las especies no-*Saccharomyces* a lo largo de la fermentación alcohólica. Cuando esta especie fue detectada desde el comienzo del encubado, las levaduras no-*Saccharomyces* no fueron encontradas más allá de las 48 horas.

6. Se detectó mayor diversidad de levaduras en los mostos en fermentación que en las uvas, lo que puede sugerir el aporte de otras especies procedentes de la maquinaria y equipos de las bodegas.

7. El equipamiento y las instalaciones de las bodegas albergan una importante población de levaduras no-*Saccharomyces*, muy superior a la de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Dentro de aquellas existe un grupo numeroso de levaduras con cierta capacidad fermentativa, capaces de colonizar los mostos y participar de forma activa en la fermentación alcohólica o de alterar los vinos.

8. Los métodos de limpieza del equipamiento y las instalaciones de las bodegas influyeron en las poblaciones de levaduras presentes, consiguiendo con la aplicación de una disolución de metabisulfito potásico una mayor eliminación de la micobiota residente en las superficies que con la utilización de productos a base de hidróxido de sodio y posterior aclarado con agua.

9. Las poblaciones de levaduras encontradas en el aire de las bodegas fueron muy bajas, inferiores a 20 NMP/m^3, a lo largo del año y en las distintas zonas de las bodegas, sin verse afectadas por factores como temperatura, humedad relativa o edad de la bodega, y sí por la actividad desarrollada.

10. El aumento en la actividad llevada a cabo en cada una de las zonas de las bodegas fue el factor determinante en la variación del tamaño de las poblaciones de levaduras detectadas en el aire, así como en la distribución de especies. En las zonas de elaboración durante la época de vinificación aumentaron las poblaciones y la especie dominante fue *Saccharomyces cerevisiae*, aunque anteriormente no hubiera sido detectada en el aire de ninguna de las zonas de las bodegas.

11. Las levaduras detectadas en el aire de las bodegas pertenecían mayoritariamente al grupo de los Basidiomicetos y Ascomicetos esporulados, que no son consideradas como alterantes de los vinos. Los géneros presentes en las bodegas estudiadas de una manera continua fueron *Cryptococcus* y *Aureobasidium*.

12. La detección en el aire de *Brettanomyces bruxellensis* mientras se manipulaban vinos contaminados con esa levadura o la identificación de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación alcohólica en el aire de la nave de elaboración y en la de embotellado, adyacente a la primera, demostraron que el aire es un medio de diseminación de microorganismos, desde mostos o vinos que están siendo manipulados al ambiente.

13. La manipulación de vinos contaminados con *Brettanomyces bruxellensis* debe hacerse con precaución evitando el paso de estas levaduras al aire, puesto que este puede ser una vía de diseminación de esta levadura alterante por la bodega.

14. La detección de levaduras presentes en el aire de las bodegas puede realizarse con distintos medios de cultivo. El medio CGA permitió la recuperación de un mayor número de levaduras, mientras que el medio AL permitió la detección de una mayor diversidad. Por su parte, el medio DBDM fue el único que permitió el aislamiento de la especie *Brettanomyces bruxellensis* en el aire.

15. Los géneros detectados de forma continua en todos los ecosistemas estudiados fueron *Cryptococcus* y *Aureobasidium*, con la excepción de las fermentaciones alcohólicas, puesto que son géneros que carecen de capacidad fermentadora.

16. Las especies no-*Saccharomyces* que participaron de manera más importante en las fermentaciones, *Candida stellata* y *Kloeckera apiculata*, no tuvieron una presencia relevante ni continua en las instalaciones ni en el aire de las bodegas.