



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

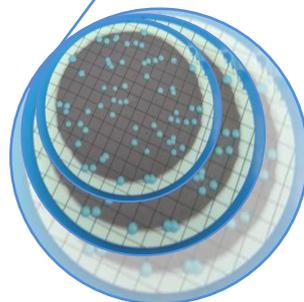


FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



**ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE
LEVADURAS**
Zygosaccharomyces
EN VINOS de URUGUAY

por
Maia Urruty



**Estudio de la presencia de levaduras del género
Zygosaccharomyces en vinos del Uruguay**

por
Maia Urruty

Tesina entregada como parte de los requerimientos
para la obtención del título de

Licenciada en Bioquímica
(Plan 2003)

Facultad de Ciencias
Universidad de la República

2012
Uruguay

Tutor: M Sc. Karina Medina

Lugar de realización: Facultad de Química, Departamento de Alimentos, Sección
Enología. UDELAR.

Corrector externo: Dra. Ana Acevedo

Agradecimientos

En primer lugar agradezco mucho a mi padre por haberme apoyado enormemente para terminar esta Licenciatura.

También agradezco muchísimo a mi hermana, Luciana, con quién viví muy cercanamente estos tiempos de tesina, por siempre interesarse y valorar mis desafíos, y por estar a mi lado.

A mi Madre y a mis Amigas, Marce, Marie, Maite y Mauge que siempre se interesaron por el mundo de la enología que fui descubriendo y me alentaron. A Gerónimo, por acompañar y motivar mi vida, y también por ser paciente aún sin comprender este mundo de la ciencia. A Amelia y Viki con quienes intercambiamos, sin reparos, grandes inquietudes, motivaciones y experiencias estudiantiles, por ser dos grandes compañeras.

A la Sección Enología por abrirme las puertas: a Karina Medina por sus enseñanzas, a Eduardo Boido por su colaboración en el muestreo de bodegas y el análisis de vinos, y a todo el equipo por estar presente en este proceso de aprendizaje, a Francisco Carrau, Laura Fariña, Eduardo Dellacassa, Mauricio Tomasso y Gabriel Pérez.

A la Dra. Ana Acevedo, correctora externa de esta tesina, por su dedicación en las correcciones y guías.

A todos los Bodegueros y Enólogos que colaboraron, a Las Croabas y al laboratorio Scala, ya que la buena disposición y generosidad de todos ellos, quienes colaboraron sin recompensa, hizo que este trabajo haya sido no solo posible sino también muy interesante.

A la ANII por otorgarme la beca de iniciación a la investigación.

Dedicado a mis Padres y a la Abuela Tona

Parte de este trabajo de tesis ha sido presentado en los siguientes congresos internacionales:

Urruty M., K. Medina, F. Carrau. 2011. Relevamiento de La presencia de levaduras *Zygosaccharomyces* en bodegas de Uruguay. XIII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología. Noviembre 2011, Santiago de Chile, Chile.

Urruty M., K. Medina, G. Pérez, F. Carrau. 2009. Estudio preliminar de la contaminación por levaduras *Zygosaccharomyces* en la industria nacional del vino. XII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología. Noviembre 2009, Montevideo-Uruguay.

Urruty M., K. Medina, G. Pérez, F. Carrau. 2009. Desarrollo y validación de un método para detección de *Zygosaccharomyces* en vinos y jugos. X Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos (COLMIC) y IX Jornadas Uruguayas de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Octubre 2009, Maldonado-Uruguay.

ÍNDICE

RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
Las levaduras en la vitivinicultura.....	9
El control microbiológico y la contaminación por levaduras.....	11
Levaduras del género <i>Zygosaccharomyces</i>	16
Detección de <i>Zygosaccharomyces</i>	20
La producción vitivinícola Uruguaya y el control microbiológico de vinos.....	22
OBJETIVOS.....	24
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Cepas de levaduras utilizadas.....	25
Medios y condiciones de cultivo.....	25
I - Evaluación del medio de cultivo diseñado GZBD.....	27
I a - Siembra en superficie de diluciones seriadas de 2 cepas de <i>Z. bailii</i>	27
I b - Siembra mediante estría de levaduras no pertenecientes al género <i>Zygosaccharomyces</i>	28
I c - Aplicación de la técnica de filtración por membrana.....	28
II - Comparación del desempeño de los medios GZBD y ZBDM mediante la técnica de filtración.....	29
II a - ZBDM vs GZBD con cepas <i>Z. bailii</i>	29
II b - <i>T. delbrueckii</i> , <i>C. railensis</i> y <i>P. stipitis</i> R30 en ZBDM.....	29
III - Búsqueda de <i>Z. bailii</i> y <i>Z. bisporus</i> en bodegas del Uruguay mediante la utilización de ZBDM.....	30
Muestreo de bodegas del Uruguay.....	30
Información recopilada de los vinos muestreados.....	31
Análisis de muestras de vino mediante la técnica de filtración por membrana y siembra en el medio ZBDM.....	31
Análisis estadístico de los resultados.....	31
RESULTADOS.....	33
I - Evaluación del medio de cultivo diseñado GZBD.....	33

I a - Siembra en superficie de diluciones seriadas de 2 cepas de <i>Z. bailii</i>	33
I b - Siembra mediante estría de levaduras no pertenecientes al género <i>Zygosaccharomyces</i>	34
I c - Aplicación de la técnica de filtración por membrana	35
II - Comparación del desempeño de los medios GZBD y ZBDM mediante la técnica de filtración.....	36
II a - ZBDM vs GZBD con cepas <i>Z. bailii</i>	36
II b - <i>T. delbrueckii</i> , <i>C. railensis</i> y <i>P. stipitis</i> R30 en ZBDM	37
III - Búsqueda de <i>Z. bailii</i> y <i>Z. bisporus</i> en bodegas del Uruguay	38
Análisis de muestras de vino mediante la técnica de filtración por membrana e incubación en medio ZBDM selectivo y diferencial para <i>Z. bailii</i> y <i>Z. bisporus</i> ..	38
Información recopilada de los vinos muestreados	39
Análisis Estadístico.....	43
DISCUSIÓN.....	44
I - Evaluación del medio de cultivo diseñado GZBD.....	44
II - Comparación del desempeño de los medios GZBD y ZBDM mediante la técnica de filtración.....	46
III- Búsqueda de <i>Z. bailii</i> y <i>Z. bisporus</i> en bodegas del Uruguay mediante la utilización de ZBDM.....	47
CONCLUSIONES	51
ANEXO	53
Composición Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD)	53
Composición Wallerstein Laboratory Nutrient (WLN)	53
Análisis de Cluster-Conglomerado de K medidas, datos adicionales de resultados: Tablas A1, A2 y A 3.....	54
BIBLIOGRAFÍA	55

RESUMEN

Existe un grupo pequeño de levaduras capaces de deteriorar alimentos que han sido procesados de acuerdo a los estándares de buenas prácticas de manufactura (GMPs), estas son llamadas “levaduras deterioradoras” (spoilage yeasts). *Zygosaccharomyces bailii* y *Zygosaccharomyces bisporus* son consideradas levaduras pertenecientes a este grupo, siendo *Z. bailii* una de las más peligrosas debido principalmente a su gran resistencia a conservantes químicos y su alta habilidad fermentativa.

Según investigaciones sobre comunidades de levaduras en uvas, *Z. bailii* se encuentra principalmente en uvas dañadas, sobreviviendo a la fermentación con *S. cerevisiae*. Los efectos comunes del deterioro del vino por levaduras son: formación de film, enturbiamiento, aparición de sedimentos, producción de gas en vinos embotellados, y olores y sabores no deseados. *Z. bailii* y *Z. bisporus* fermentan azúcares generando abundante gas, son resistentes al etanol, bajo pH, restricción de oxígeno y a conservantes utilizados en la industria del vino.

La presente investigación estudia la incidencia de contaminación por levaduras *Z. bailii* y *Z. bisporus* en 17 bodegas del Uruguay ubicadas en los departamentos de Canelones, Montevideo, Colonia, Soriano, Maldonado, Artigas y Salto. La metodología elegida para el análisis de vinos fue la filtración por membrana de 0.45 μm y posterior incubación de las membranas en un medio de cultivo diferencial y selectivo para *Z. bailii* y *Z. bisporus* (ZBDM).

Según los resultados obtenidos el 29,4% de las bodegas muestreadas presentó contaminación por *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* en alguno de sus vinos. Las muestras contaminadas fueron originarias de los departamentos de Artigas, Maldonado y Canelones. Las poblaciones de *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* detectadas estuvieron en todos los casos dentro de lo reportado como muy riesgoso para la estabilidad del vino. Los vinos contaminados presentaron niveles de SO_2 molecular promedio de 0,54 mg/L \pm 0,09 y valores de pH promedio de 3,67 \pm 0,04. Este trabajo evidencia y localiza por primera vez la presencia de levaduras “deterioradoras” *Z. bailii* y *Z. bisporus* en la industria vitivinícola del Uruguay.

INTRODUCCIÓN

Las levaduras en la vitivinicultura

Las uvas poseen una compleja biodiversidad microbiana, que abarca desde hongos filamentosos, levaduras y bacterias; todos estos con diferentes características e impactos químico-sensoriales sobre la producción del vino. Algunos son capaces de sobrevivir en el vino, principalmente bacterias lácticas, bacterias acéticas y levaduras. Las levaduras son los microorganismos que llevan a cabo la conversión del mosto de uva a vino, principalmente a través de la fermentación alcohólica de los azúcares presentes a alcohol y otros compuestos. La diversidad y riqueza de las levaduras en las uvas varía según el estado de maduración, la disposición de nutrientes y la integridad de las bayas, así como de la región geográfica, las condiciones climáticas, las prácticas culturales de viticultura y las enfermedades que las vides enfrenten. La ecología de las levaduras presentes en las uvas es un área de estudio en creciente desarrollo (Barata, Malfeito-Ferreira et al. 2011).

Se conoce actualmente que luego del envero la microbiota de las uvas intactas es dominada por levaduras Basidiomycetes (e.g. *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp. *Sporobolomyces* spp), y a raíz del aumento en la disponibilidad de nutrientes a medida que avanza la maduración (debido al afinamiento y las posibles microfisuras de la cutícula) dominan también levaduras oxidativas o malas fermentadoras, del grupo de los Ascomycetes (e.g. *Candida* spp., *Hanseniaspora* spp., *Metschnikowia* spp., *Pichia* spp.) (Barata, Malfeito-Ferreira et al. 2011). En uvas dañadas, las altas concentraciones de azúcares salen del jugo de la pulpa al exterior del grano posibilitando el crecimiento de levaduras que en uvas sanas no encontrarían un ambiente propicio. Aumenta aquí aún más la diversidad, encontrándose levaduras del grupo de los Ascomycetes, *Issatchenkia* spp. y *Zygoascus hellenicus*, de las peligrosas levaduras deterioradoras de vinos (e.g. *Zygosaccharomyces* spp., *Torulaspora* spp) y de las levaduras tradicionales de la fermentación alcohólica, *Saccharomyces cerevisiae* (Fleet 2003; Barata, Gonzalez et al. 2008; Barata, Seborro et al. 2008; Barata, Malfeito-Ferreira et al. 2011).

Las levaduras que resisten las condiciones del vino y son encontradas en mostos

en fermentación o en vinos terminados son llamadas levaduras del consorcio microbiano del vino (WMC). Este comprende levaduras *H. uvarum*/*K. apiculata* (apiculadas), *Candida* spp. (formadoras de films), *Metshinikowia* spp., *Pichia* spp. (formadoras de films), *Debariomyces lachancea* spp., *Torulasporea* spp., *Zygosaccharomyces* spp. (*Z. bailii* y *Z. bisporus*), *Dekkera/Brettanomyces* spp., *Saccharomyces* spp. (*S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*), *Schizosaccharomyces* spp. y *Sacharomycodes* spp. (*S. ludwigii*) (Barata, Malfeito-Ferreira et al. 2011).

El rol que juegan las levaduras en la producción del vino puede ser positivo o negativo, o un balance de ambos. Y depende principalmente de las características metabólicas de las levaduras, las características del mosto y de las prácticas de vinificación empleadas. Actualmente es muy popular el uso de levaduras *S. cerevisiae* comerciales para la fermentación alcohólica del mosto de uva. El uso de estos preparados comerciales se acompaña de la supresión del resto de las levaduras nativas presentes en el mosto mediante la adición de pequeñas dosis de anhídrido sulfuroso en las etapas iniciales de la fermentación alcohólica. La inoculación de estas levaduras comerciales de *S. cerevisiae* tiene la ventaja de generar un fácil control del proceso, ya que la levadura que llevará adelante la fermentación alcohólica posee un metabolismo primario capaz de fermentar casi la totalidad de los azúcares presentes en el mosto debido a su resistencia al etanol (Peynaud 1996). Así se logra hasta cierto punto una fermentación segura, sin paradas de fermentación y sin defectos sensoriales. Por otro lado su uso tiene la desventaja de no aportar gran complejidad, identidad y variabilidad al sabor de los vinos (Romano, Fiore et al. 2003). Además a menudo estas cepas no se encuentran bien adaptadas a los niveles de nitrógeno asimilable presentes en los mostos, y es necesaria la adición de amonio. Lo cual trae consigo la pérdida de aromas e identidad del vino y la producción de aminas biógenas (Carrau, Medina et al. 2008).

Es por los motivos anteriores que nos encontramos a nivel mundial en un momento de intensa y creciente investigación en la búsqueda y caracterización de levaduras del WMC no pertenecientes al género *Saccharomyces* y sus posibles aportes positivos en la elaboración del vino (Fleet 2008). Algunas de estas

levaduras poseen características diferentes e interesantes en cuanto a su metabolismo secundario, aportando agradables aromas fermentativos, una mayor producción de compuestos que estabilizan el color del vino (polisacáridos y compuestos derivados de antocianos) y un aumento en la producción de glicerol la que mejora el cuerpo del vino, entre otras (Medina, Boido et al. 2005; Fleet 2008). Paradójicamente, uno de los principales contaminantes de vinos también son las levaduras, es así que a menudo vinos terminados se ven deteriorados por el desarrollo de levaduras que resisten las condiciones estresantes de este medio, generando grandes pérdidas a nivel mundial.

El control microbiológico y la contaminación por levaduras

El cumplimiento de estándares estrictos de higiene y esterilización en las instalaciones de las bodegas, es el punto inicial y principal del control microbiológico en la producción del vino (Loureiro and Malfeito-Ferreira 2003; Tristezza, Lourenco et al. 2010). El control microbiológico se prolonga durante toda la cadena productiva, siendo más estricto en las etapas iniciales de la vinificación y durante el proceso de envasado. Para la higiene y desinfección de instalaciones de bodega, se utilizan detergentes y desinfectantes, cuyos ingredientes activos son: hidróxido de sodio, ácido peracético, hipoclorito de sodio (cada vez menos frecuente), yodóforos, alquilbenzenesulfonato de sodio y acetato de alquilamina. También es frecuente la ozonización, principalmente en la desinfección de barricas de roble. Cuando las aplicaciones mencionadas anteriormente no son suficientes, se forman biofilms en las superficies de tanques, superficies y conductos. Estas comunidades microbianas adheridas a superficie y embebidas en una matriz polimérica extracelular autoproducida son mucho más resistentes que los microorganismos en suspensión a los biocidas y antibióticos, una vez formados son muy difíciles de remover y constituyen una importante fuente de contaminación (Tristezza, Lourenco et al. 2010).

En los primeros pasos del procesamiento de la uva para la elaboración del vino, es muy corriente y tradicional a nivel mundial el sulfitado del mosto, para luego proceder a la inoculación de las levaduras que llevarán adelante la fermentación, usualmente *S. cerevisiae*. El objetivo del sulfitado del mosto es inhibir la flora

nativa de bacterias y levaduras (y con ello también los posibles microorganismos contaminantes) mediante la utilización de este conservante químico del grupo de los ácidos débiles. Actualmente la forma más utilizada para sulfitar es el agregado de metabisulfito de sodio o de potasio, pero también puede ser utilizado en forma de gas comprimido, o mediante la combustión de azufre. Además este conservante posee efecto antioxidante protegiendo de la oxidación y de la pérdida de color en vinos tintos. También potencia la extracción de polifenoles de la cáscara de la uva durante la maceración y por otro lado en dosis bajas puede generar una mejora gustativa por reaccionar con el acetaldehído y bloquearlo (Peynaud 1996). En su forma molecular este conservante posee poder antimicrobiano, dicha forma activa es ajustada con periodicidad luego de terminada la fermentación para mantener una concentración que prevenga contra el desarrollo microorganismos deterioradores del vino en las etapas de maduración y envejecimiento. La acción antimicrobiana de este conservante es dependiente del pH, siendo mucho más activo en medios ácidos, a $\text{pH} = 3$ el 5-10% del anhídrido sulfuroso se encuentra en la forma molecular y a $\text{pH} = 4$ este porcentaje tiende a cero. A nivel mundial existe una tendencia a reducir las cantidades de conservantes utilizados en alimentos y de sulfitos en vinos, esto se debe a la creciente preocupación por la salud y la preferencia por los alimentos más naturales. La legislación de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), autoridad regulatoria que incluye a la mayoría de los países productores de vino, establece para el contenido de anhídrido sulfuroso en vinos un nivel máximo autorizado de 150 mg/L de sulfitos totales para vinos tintos secos, 200 mg/L para vinos blancos y rosados secos, 300 mg/L para vinos dulces rosados y blancos, y 400 mg/L para vinos blancos dulces especiales y vinos con Botrytis (oeno 9/98)(OIV 2012). Según el reglamento vitivinícola del MERCOSUR (MERCOSUR/GMC/RES N° 45/96) los límites admitidos de anhídrido sulfuroso total en vinos son como máximo de 250 mg/L, y según la legislación Uruguaya para vinos de calidad preferente (Decreto 283/993) de 200 mg/L para vinos con menos de 4 g/L de azúcares residuales y 300 mg/L para vinos con más de 4 g/L de azúcares residuales. Por otro lado en los últimos años se ha comenzado a utilizar también el fungicida dimetildicarbonato (DMDC), principalmente antes del embotellado del vino.

Generalmente su uso es complementario al de anhídrido sulfuroso ya que sus efectos son sinérgicos, lo cual permite reducir los niveles de sulfitos en vino. La eficiencia del DMDC depende de las cepas y cantidad de levaduras presentes, la temperatura, el pH y la graduación alcohólica. Sus límites de aplicación son 200mg/L en Europa, 200 ppm en Estados Unidos y 200 mg/kg en Australia (Delfini, Gaia et al. 2002; Divol and Lonvaud-Funel 2005). En Uruguay ha sido recientemente permitido su uso. Tanto el DMDC como el SO₂ producen la muerte de las levaduras (su resistencia varía entre especies y cepas) y también la entrada parcial de estas en un estado viable pero no cultivable (VBNC) en el cual son metabólicamente activas pero incapaces de multiplicarse, al cambiar las condiciones fisicoquímicas del medio estas pueden salir de dicho estado y proliferar (Divol and Lonvaud-Funel 2005).

Los avances en la tecnología para la producción de vino, en la aplicación de los estándares de buenas prácticas de manufactura (GMP's), como en el diseño de los equipos, los procedimientos de sanitización y el uso de conservantes entre otras, ha llevado a que los deterioros más frecuentes en vinos hayan pasado de estar dadas por la acción de bacterias lácticas y acéticas a deberse a la proliferación de levaduras (Loureiro and Malfeito-Ferreira 2003). Las levaduras se convierten en los organismos contaminantes dominantes cuando la competencia con los otros microorganismos (bacterias y hongos filamentosos) está restringida por el bajo pH, la presencia de conservantes y el alcohol. En vinos las levaduras contaminantes pertenecen a las especies: *Z. bailii*, *T. delbruekii*, *D. bruxellensis*, *S. cerevisiae*, *S. ludwigii*, *K. apiculata*, *P. membranifaciens*, *Candida spp.*, *P. anómala*, *L. elongisporus*, *Rhodotorula spp.* y *Trichosporon spp.* De estas, las más peligrosas, capaces de afectar vinos que han sido procesados de acuerdo a las GMP's son *Z. bailii*, *D. bruxellensis* y *S. cerevisiae*, debido principalmente a su tolerancia a los ambientes ácidos y a su resistencia los conservantes ácidos débiles, estas son llamadas "levaduras deterioradoras" (Loureiro and Malfeito-Ferreira 2003).

S. cerevisiae, *S. ludwigii*, *T. delbruekii* y *K. apiculata/H. uvarum*, son también capaces de generar grandes deterioros en ciertas condiciones. *Pichia spp.*, *Candida spp.*, *L. elongisporus*, *Rhodotorula spp.* y *Trichosporon spp.* son consideradas de menor importancia e indicadoras de mala higiene y bajos niveles de GMP's, dado que con

buenas prácticas se previene fácilmente su desarrollo. *P. membranifaciens*, *P. anómala*, y *Candida spp.*, son levaduras conocidas por formar films en las superficies del vino.

En las bebidas fermentadas el concepto el deterioro debido a levaduras tiene un significado más complejo que en alimentos no fermentados, ya que en vinos la actividad de las levaduras es esencial durante la fermentación, y sus metabolitos contribuyen al aroma, sabor y característica del producto final, aquí es difícil distinguir claramente entre la actividad beneficiosa y negativa.

Generalmente se advierte la actividad de levaduras deterioradoras de vino durante el almacenaje o maduración de este, cuando los efectos nefastos sobre el vino terminado son más evidentes (Loureiro and Malfeito-Ferreira 2003).

Los defectos comunes generados por la contaminación con levaduras son la formación de films en superficie, de turbidez por levaduras en suspensión, de precipitados o sedimentos, de gas en vinos embotellados, y la producción de aromas y sabores no deseados en todas las etapas de la producción del vino (Loureiro and Querol 1999; Loureiro and Malfeito-Ferreira 2003). Desde el punto de vista aromático, los típicos defectos producidos por levaduras son la producción de etilacetato (aroma avinagrado) por levaduras apiculadas después de la fermentación, la producción de acetaldehído por levaduras formadoras de film durante el almacenaje y la producción de fenoles volátiles por *Dekkera bruxellensis* durante el almacenaje. Dentro de las levaduras apiculadas (forma alimonada) se encuentran especies de los géneros *Kloeckera/Hanseniaspora*, dichas levaduras pueden ser controladas fácilmente con las medidas adecuadas, como el agregado de anhídrido sulfuroso, el control de baja temperatura y la higiene. Las levaduras formadoras de film son especies de los géneros *Candida* y *Pichia*, aunque *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* y *Z. bailii* también han sido encontradas en films en vinos. *Candida* y *Pichia* producen acetaldehído (aroma oxidado, a manzana podrida), estas levaduras son fácilmente controladas debido a su poca tolerancia a bajas presiones de oxígeno, lo cual aumenta el efecto inhibitorio del etanol y los conservantes, estas especies son indicadoras de deficientes GMP's. Las levaduras fermentadoras, *S. cerevisiae* y *S. bayanus* pueden también causar defectos aromáticos en vinos debido a la producción de compuestos reducidos de azufre

durante la fermentación (ácido sulfhídrico, huevo podrido) (Malfeito-Ferreira 2011).

Una vez detectado el deterioro producido por levaduras, se suelen aumentar los niveles de conservantes hasta los máximos niveles permitidos o filtrar el vino, medidas que a menudo no logran revertir las pérdidas generadas, y en cierta medida también contribuyen a una disminución en la calidad del producto.

Para la evaluación de la calidad microbiológica del vino de acuerdo a métodos estandarizados, es necesaria la utilización de indicadores microbiológicos. En vinos producidos bajo las GMP's la mayor preocupación microbiológica es el desarrollo de las "levaduras deterioradoras" por lo cual un indicador apropiado debería evaluar la presencia de levaduras *Z. bailii*, *D. bruxellensis*, etc. Estas podrían ser evaluadas mediante indicadores basados en medios de cultivo selectivos y diferenciales, por indicadores químicos u organolépticos que evidencien su presencia, ó por indicadores basados en biomarcadores. Sin embargo las evaluaciones microbiológicas que se realizan en bodegas, casi sin excepciones, corresponden a un recuento de levaduras viables totales, para el cual es utilizado algún medio de cultivo general, por lo cual los resultados no son buenos indicadores de la calidad microbiológica, la estabilidad y calidad de los vinos (Loureiro and Malfeito-Ferreira 2003).

No existen reglamentaciones serias en cuanto a la contaminación por levaduras, la OIV no define una población máxima permitida de levaduras totales en vino, sólo establece que este debe ser lo más límpido posible (sin turbidez y sin presencia de sedimentos de origen microbiológico). Para ello la población deberá ser inferior a 10^4 - 10^5 UFC/mL para levaduras que producen sedimentos finos, o menor de 10^2 - 10^3 UFC/mL para levaduras que producen sedimentos grumosos (Loureiro and Malfeito-Ferreira 2003).

En respuesta a la problemática de la contaminación de vinos se han desarrollado modelos matemáticos comerciales predictivos de su estabilidad, con los cuales es posible calcular el anhídrido sulfuroso libre necesario para asegurar la estabilidad microbiológica en función del pH y la graduación alcohólica que presenta cada vino en particular. Estas herramientas no han tenido aceptación por parte de la industria, donde en general se continúa considerando el recuento de levaduras

viables totales para estimar la estabilidad microbiológica del vino. En Australia, según datos recolectados en 2001, el medio de cultivo más utilizado para este fin es el Wallerstein Laboratories Nutrient (WLN; composición en Anexo), un medio general con características diferenciales (Loureiro and Malfeito-Ferreira 2003).

Levaduras del género *Zygosaccharomyces*

Las levaduras del género *Zygosaccharomyces* son conocidas por ser contaminantes muy problemáticos en la industria de los alimentos y generar grandes pérdidas a nivel mundial. Las especies más reportadas en alimentos contaminados son *Z. rouxii* en jugos y concentrados de jugos y *Z. bailii* en jugos, mayonesas, salsas y vinos (Thomas and Davenport 1985; James and Stratford 2003; Dang, Vermeulen et al. 2009; Pitt and Hocking 2009). *Z. bailii* es la segunda levadura más peligrosa como contaminante de vinos (luego de *D. bruxellensis*) y *Z. bisporus* comparte la mayoría de las características fisiológicas de esta pero se encuentra mucho menos distribuida y reportada (Romano and Suzzi 1993; Schuller, Corte-Real et al. 2000; James and Stratford 2003; Di Maro, Ercolini et al. 2007; Barata, Malfeito-Ferreira et al. 2011). Ambas pueden resistir las condiciones del vino y desarrollarse en él.

La presencia de *Z. bailii* es bien conocida en bodegas, fundamentalmente en las que producen vinos dulces, encontrándose en las líneas de embotellado donde se utiliza mosto sulfitado o concentrado, pero también ha sido hallada en vinos secos (Thomas and Davenport 1985; Fleet 1992; Loureiro and Malfeito-Ferreira 2003; Pitt and Hocking 2009). Los efectos de su desarrollo y proliferación en vinos terminados son: generación de turbidez, producción de abundante gas por fermentación de los azúcares residuales, formación de precipitados, de films en superficie y el consiguiente deterioro sensorial, visual, de sabor y aromático sin implicar un aroma no deseado característico de esta especie (Loureiro and Malfeito-Ferreira 2003).

Microscópicamente *Z. bailii* posee forma ovoide a cilíndrica, presenta gemación multipolar y formación de pseudohifa simple. Estas levaduras son haploides y heterotálicas por lo cual la esporulación requiere la unión previa por conjugación de dos levaduras de tipo compatible. Los ascos son de forma globular para *Z. bailii* (donde cada conjugante produce dos ascoesporas suavemente redondeadas) a

diferencia de *Z. bisporus* en la cual son como mancuernas (Fugelsang and Edwards 2007).

Debido a su importancia como contaminante, las características fisiológicas de *Z. bailii* han sido estudiadas ampliamente. En general los experimentos han sido realizados en YEPD y no en vino o medio símil vino por lo cual los resultados no son totalmente aplicables a lo que ocurre en los vinos. Por otro lado se ha observado mucha variabilidad en cuanto a dichas características dentro de esta especie. De todas formas, casi todos los autores concluyen que esta especie presenta buena capacidad fermentativa, gran resistencia a conservantes, osmotolerancia y resistencia a etanol, todas estas implicadas en su capacidad para desarrollarse en vinos. Levaduras de esta especie sobreviven durante la fermentación con *S. cerevisiae* (Barata, Gonzalez et al. 2008).

Z. bailii posee gran habilidad fermentativa de los azúcares presentes en el vino, y es fructofílica (en presencia de glucosa y fructosa utiliza la fructosa más rápidamente). Este comportamiento ha sido estudiado en detalle. La fructosa es transportada por un sistema específico de alta capacidad y baja afinidad; la presencia de fructosa inactiva el transportador de glucosa siendo esta inactivación más rápida a altas concentraciones, además la fructosa compite con la glucosa por el transportador de glucosa (Sousa-Dias, Goncalves et al. 1996). Estas especies fermentan vigorosamente los azúcares, generando abundante gas. En medios ricos nutricionalmente son capaces de proliferar aún en ausencia total de oxígeno y bajo presión por presencia de CO₂ (Rodrigues, Corte-Real et al. 2001; Pitt and Hocking 2009). *Z. bailii* es incapaz de crecer a 4°C, y a 37°C sólo algunas de las cepas se desarrollan (Martorell, Stratford et al. 2007), su temperatura óptima de crecimiento es entre 29-31°C dependiendo la cepa (Jermini and Schmidt-Lorenz 1987). En cuanto al pH, estas especies son en general capaces de crecer a pH de 2,2, lo cual explica su presencia en vinos (Jermini and Schmidt-Lorenz 1987; Fugelsang and Edwards 2007). *Z. bailii* es osmotolerante (James and Stratford 2003) y resistente a la presencia de etanol. La concentración de etanol a la cual puede desarrollarse varía según la cepas estudiada, y se encuentra entre 10-20% V/V (Fugelsang and Edwards 2007; Martorell, Stratford et al. 2007). Por último su característica más importante consiste en presentar resistencia muy alta a los

conservantes ácidos débiles utilizados en la industria alimenticia (ácido sórbico, ácido acético, ácido benzoico, ácido láctico, anhídrido sulfuroso, etc.), por ejemplo crece a 800mg/L de ácido benzoico (Pitt and Hocking 2009). La baja permeabilidad de *Z. bailii* a estos conservantes ácidos a bajo pH y su habilidad para metabolizar compuestos ácidos aún en presencia de glucosa son algunos de los mecanismos implicados en su alta tolerancia. En particular las resistencias reportadas para el anhídrido sulfuroso son: 2-3mg/L en su forma molecular (Fugelsang and Edwards 2007), entre 65-307 mg/L de anhídrido sulfuroso total (Pilkington and Rose 1988; Martorell, Stratford et al. 2007). El grado de inhibición de la fermentación de glucosa por la presencia de etanol en *Z. bailii* es exponencial y de magnitud comparable con la reportada para *S. cerevisiae*. El ácido acético también inhibe la fermentación de forma exponencial pero mucho menos pronunciada que para *S. cerevisiae*, además en *Z. bailii* los efectos del ácido acético no son potenciados por la presencia de etanol. *Z. bailii* tiene la habilidad de metabolizar el ácido acético en presencia de mezclas de diversos azúcares (Sousa, Miranda et al. 1996; Fernandes, Corte-Real et al. 1997; Sousa, Rodrigues et al. 1998).

Las resistencias reportadas de *Z. bailii* frente al DMDC son de 250-400 mg/L según el trabajo de Delfini y col. (2002), según Divol y col. es de 200 mg/L para cultivos puros y en cultivos mixtos entra en estado VBNC (2005), el trabajo de Martorell y col. reporta una concentración mínima inhibitoria entre 241-255 mg/L (2007), y según Fugelsang y col. la resistencia a DMDC de *Z. bailii* se encuentra entre 50-150 mg/L (2007).

Z. bailii puede generar deterioros en vinos terminados aún a partir de poblaciones muy pequeñas (Loureiro and Malfeito-Ferreira 2003; Fugelsang and Edwards 2007; Pitt and Hocking 2009), lo que hace difícil su detección en la bodega. Por esta razón, el control de calidad más efectivo, es evaluar la presencia de *Z. bailii* en el producto final (Pitt and Hocking 2009).

Por otro lado *Z. bailii* también es considerada una especie interesante a investigar para posibles aplicaciones enológicas por su habilidad fermentativa, su resistencia a etanol así como su resistencia al SO₂. Se han estudiado fermentaciones de mosto de uva con cultivos puros de cepas de *Z. bailii* observándose que estas levaduras

presentan características beneficiosas. Fermentan de forma lenta casi la totalidad de los azúcares presentes, flocculan, consumen alrededor del 50-70 % del ácido málico, y producen bajas cantidades de ácido sulfhídrico, de dióxido de azufre y ácido acético (Romano and Suzzi 1993). Además también fueron estudiadas la producción de acetoína, de 2,3-butanodiol y de glicerol en fermentaciones puras de mosto de uva encontrándose que los niveles de 2,3-butanodiol son altos, de 0,3 g/L cantidad comparable a la producida por *S. cerevisiae*, y la producción de acetoína baja, 20 mg/L, estos resultados fueron característicos de la especie (Romano, Brandolini et al. 1998), y la producción de glicerol es alta y comparable con la producida con *S. cerevisiae*, de 6,81-8,15 g/L (Brandolini, Salzano et al. 2002). Tanto para *Z. bailii* como para *Z. bisporus* se observaron niveles óptimos con baja variabilidad en la pureza de fermentación (acidez volátil/etanol), además la acidez volátil producida y los niveles de acetaldehído y etil-acetato fueron variables pero bajos e inferiores a los producidas por *S. cerevisiae* (Domizio, Romani et al. 2011). En cuanto a la producción de polisacáridos se ha encontrado un aumento de estos tanto en fermentaciones puras como en mixtas de *Z. bailii/S. cerevisiae* en comparación con la fermentación pura de *S. cerevisiae* (Domizio, Romani et al. 2011). Por otro lado, levaduras de esta especie se consideran referentes en cuanto a consumo de ácido acético y se estudian sus condiciones para la reducción de acidez volátil en vinos defectuosos (Vilela-Moura, Schuller et al. 2008). Debido a las características antes mencionadas es coherente pensar que es posible encontrar y seleccionar cepas de *Z. bailii* y *Z. bisporus* con buenas aplicaciones enológicas (Fleet 2008).

Cabe aclarar que aún pese a lo expuesto anteriormente *Z. bailii* y *Z. bisporus* son levaduras contaminantes de vinos. El hecho de que cepas de dichas especies presenten muy alta resistencia a los conservantes utilizados en la industria del vino y las características metabólicas descritas anteriormente, hacen que estas levaduras sean capaces de desarrollarse en los vinos terminados lo cual implica los defectos ya mencionados. Es por esto que el uso de cepas de *Z. bailii* o *Z. bisporus* en la producción del vino debe ser minuciosamente evaluado y controlado.

Detección de *Zygosaccharomyces*

Las técnicas tradicionales para la recuperación de levaduras resistentes a conservantes de alimentos y bebidas son la siembra en un medio de cultivo conteniendo 0,5% de ácido acético glacial (Pitt and Hocking 2009). Esto es debido a que cuando se quieren recuperar levaduras de crecimiento lento, que están presentes en una baja proporción en la muestra, es aconsejable la utilización de un medio selectivo que favorezca las condiciones para el desarrollo de dichas levaduras y/o mejore su competitividad frente al resto. Una posible técnica a utilizar, cuando no se pretende cuantificar la población presente, es la siembra de un volumen dado de muestra en un medio de cultivo líquido selectivo, con lo cual se promueve la proliferación de las levaduras de interés, y la posterior siembra del cultivo en un medio sólido para aislar e identificar la levadura de interés. La otra técnica adecuada para estos casos es la filtración de la muestra a través de una membrana de 0,45 μm de poro, con lo cual se logra concentrar las levaduras presentes en la muestra sobre la superficie de la membrana y la posterior siembra de esta membrana sobre el medio de cultivo selectivo. De esta forma luego de haber identificado el número de colonias correspondientes a las levaduras de interés, se puede cuantificar la concentración de estas en la muestra. En general mediante la utilización del medio general suplementado con 0,5% de ácido acético se recuperan las especies *Z. bailii*, *S. Pombe*, algunas cepas resistentes a conservantes de *P. membranifaciens*, *S. cerevisiae*, y también otras cepas de resistencia intermedia a conservantes como *Debaryomyces hansenii*, *Candida krusei* y *Torulaspota delbrueckii* (Pitt and Hocking 2009).

En particular para la detección de *Z. bailii*, se han desarrollado dos medios de cultivo selectivos. El primero, *Z. bailii* selective agar (ZBA), está basado en el medio Sabouraud dextrosa agar con el agregado de fructosa, NaCl, triptona, extracto de levadura, trypan®, ácido acético 0,5% y sorbato de potasio 0,01%. ZBA fue diseñado para la detección de *Z. bailii* en alimentos acidificados mediante la técnica de filtración por membrana. Este es mucho más selectivo para *Z. bailii* que el medio general suplementado con ácido acético, pero las recuperaciones obtenidas de células estresadas son menores que en el primero, además su preparación es más

compleja (Pitt and Hocking 2009). Posteriormente otro medio selectivo y diferencial fue diseñado para detectar *Z. bailii* y *Z. bisporus* en vinos: *Z. bailii* differential media (ZBDM) (Schuller, Corte-Real et al. 2000). ZBDM está basado en investigaciones previas sobre la metabolización y transporte de ácidos por *Z. bailii* (Sousa, Miranda et al. 1996; Sousa, Rodrigues et al. 1998), este medio contiene como única fuente de carbono y energía: 0,1% glucosa y 0,4% ácido fórmico, dichas concentraciones fueron optimizadas en su validación y resultaron del compromiso entre selectividad y recuperación de *Z. bailii* y *Z. bisporus*. Este es un medio rico en minerales, oligoelementos, vitaminas y fuente de nitrógeno, formulado a pH 4,5 con verde de bromocresol como reactivo indicador de pH.

Z. bailii y *Z. bisporus* logran desarrollarse en ZBDM al ser capaces de metabolizar el ácido fórmico aún en presencia de glucosa, consumen ambos sustratos en una primera etapa y luego el ácido remanente, por lo tanto alcalinizan el medio virando el indicador de pH de verde a azul. Este medio de cultivo es aún más complejo que el ZBA pero posee la ventaja de ser diferencial y permitir la diferenciación entre las colonias de *Z. bailii*, *P. membranifaciens* y *S. cerevisiae* (Schuller, Corte-Real et al. 2000). ZBDM fue desarrollado para detectar estas levadura en muestras de vino utilizando la técnica de filtración a través de membrana e incubación a 30°C, *Z. bailii* y *Z. bisporus* viran el color del medio de verde a azul y solo ellas se desarrollan como colonias circulares de coloración celeste-azulada. Este medio de cultivo ha sido patentado y existen muy buenos antecedentes de su uso en la recuperación de *Z. bailii* de uvas, mostos y vinos (Barata, Gonzalez et al. 2008; Barata, Seborro et al. 2008).

Por otro lado, actualmente se cuenta con el desarrollo tecnológico para detectar *Z. bailii* mediante técnicas moleculares rápidas de análisis de ADN ó ARN. Estas pueden ser utilizadas directamente sobre la muestra de vino, o indirectamente para identificar las colonias que fueron cultivadas previamente. Cuando se utilizan indirectamente se debe tener en cuenta que los resultados representan a las especies que fueron recuperadas con el medio de cultivo utilizado, para la recuperación de *Z. bailii* es necesario utilizar medios de cultivo selectivos. El análisis indirecto (Hibridización, secuenciación, ARDRA, RAPD/PFGE/AFLP, mt-RFLP, etc.) es generalmente más sensible y logra diferenciar cepas de la misma

especie mientras que las técnicas directas (DGGE/TGGE, PCR en tiempo real, secuenciación, PCR, FiSH, EMA-PCR, etc.) son en general más rápidas y menos específicas, siendo muy utilizadas para el análisis de comunidades o la rápida identificación (Ivey and Phister 2011). Los métodos directos tienen la ventaja de detectar las levaduras en estado VBNC que no son cultivables, además para *Z. bailii* se ha optimizado el uso del colorante EMA en qPCR (PCR en tiempo real) para descartar las células no viables de la cuantificación. Esto es de interés ya que como el ADN es estable puede ser detectado por PCR aunque el microorganismo este muerto, EMA se une al ADN de las células muertas dejándolo inactivo para las reacciones de la PCR (Rawsthorne and Phister 2009).

Todas estas técnicas moleculares presentan la ventaja de permitir una precisa identificación de las levaduras a nivel de especie, lo cual no es posible lograr en la misma medida con las técnicas clásicas. En general es reconocido que con la identificación clásica: morfológica, bioquímica o fisiológica, se ha llegado a identificaciones erróneas debido a la alta diversidad de fenotipos posibles dentro de una misma especie (Barata, Malfeito-Ferreira et al. 2011). Por otro lado la desventaja de las técnicas moleculares radica en ser todavía lejana su implementación en la industria, debido a los costosos equipamientos y reactivos que involucran, y a la necesidad de personas específicamente entrenadas.

La producción vitivinícola Uruguay y el control microbiológico de vinos

La industria del Vino Uruguay se compone por 258 bodegas productoras de vino, de las cuales el 52% son pequeños establecimientos que producen menos de 100.000 litros anuales. La producción nacional anual de vino es de 800.000 hectolitros (2009), el 97 % de estos son consumidos localmente y el 3% exportados. La variedad de *vitis vinífera* con mayor superficie de cultivo es la Tannat con 1.784 Ha. correspondiendo al 25% del total de 7.500 Ha. plantadas. Desde los años 70's se producen en Uruguay vinos finos, la variedad Tannat es considerada actualmente la variedad insignia del país gracias a la estrategia de producir vinos de alta calidad con esta uva, optimizando las herramientas tecnológicas y desarrollando el conocimiento y la investigación sobre las

propiedades y características de su vinificación (Boido, Lloret et al. 2003; Boido, Medina et al. 2009; Carrau, Boido et al. 2011).

En cuanto a la investigación referente a la contaminación debida a microorganismos en vinos Uruguayos, se han realizado trabajos en relación a la levadura contaminante *D. bruxellensis* y de la micotoxina ocratoxina A (OTA).

Se ha desarrollado y patentado a nivel nacional un medio de cultivo selectivo y diferencial para la detección de *Dekkera/Brettanomyces* en bodega, "AQUIBRETT" (Pérez, Boido et al. 2010). Durante este trabajo se detectó *Dekkera/Brettanomyces* en vinos Uruguayos de la variedad Tannat tanto en botella como en barrica en estudios realizados durante los años 2004 y 2006.

La presencia de la micotoxina OTA fue cuantificada mediante HPLC en 22 vinos de la variedad Tannat pertenecientes a diferentes bodegas uruguayas, durante dos años consecutivos, 2007 y 2008. En ambos años, los 22 vinos producidos presentaron niveles muy inferiores al límite permitido por la OIV de 0,2 µg/L (Ferrari 2010).

A nivel industrial, en Uruguay, a excepción de un muy reducido número de bodegas líderes en calidad, no se realiza un control de rutina de la calidad microbiológica de los vinos. Por lo general, en las que si lo realizan, éste consiste en un recuento de levaduras totales en medios generales para cultivo de levaduras y a veces en WLN. En algunas de estas bodegas se evalúa también la presencia de *Dekkera/Brettanomyces* en los vinos que son estacionados en barrica, mediante la utilización de "AQUIBRETT".

Debido a la creciente conciencia a nivel mundial en la importancia de la calidad microbiológica de los alimentos se hace necesario continuar con la investigación y la mejora de los controles microbiológicos para así elevar la calidad e inocuidad de los vinos nacionales. Con dicho fin, dada la ausencia total de referencias y antecedentes en esta temática, nos proponemos generar conocimiento acerca de la presencia de las levaduras contaminantes *Z. bailii* y *Z. bisporus* en vinos Uruguayos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudio la presencia de las levaduras contaminantes *Z. bailii* y *Z. bisporus* en la industria nacional del vino.

Objetivos específicos

1. Evaluación y elección de un medio de cultivo selectivo y diferencial para la detección de *Z. bailii*.
2. Estudio de la presencia de *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* en vinos Uruguayos mediante la utilización de un medio de cultivo selectivo y diferencial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de levaduras utilizadas

En este trabajo se utilizó la cepa comercial *Saccharomyces cerevisiae* OC2 (*S. cerevisiae* OC2), y una colección de cepas de levaduras no pertenecientes al género *Saccharomyces* encontradas comúnmente en bodegas; todas ellas procedentes de la Sección Enología de Facultad de Química. A su vez se utilizaron dos cepas de *Zygosaccharomyces bailii* (*Z. bailii*): *Z. bailii* 1206 y *Z. bailii* 1265 proporcionadas por la Universidad de Minho, Portugal (Tabla I).

Tabla I. Cepas de levaduras utilizadas y su origen.

Cepa	Origen (a)
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> 00/19	Secc. Enol.
<i>Issatchenkia terricola</i> 06/21	Secc. Enol.
<i>Schizosaccharomyces Pombe</i>	Secc. Enol.
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Secc. Enol.
<i>Torulaspora delbruecki</i> 1550	Secc. Enol.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> OC2	Secc. Enol.
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Secc. Enol.
<i>Pichia stipitis</i> R30	Secc. Enol.
<i>Pichia stipitis</i> 7124	Secc. Enol.
<i>Cryptococcus flavescens</i> 00/7	Secc. Enol.
<i>Candida railensis</i> 00/22	Secc. Enol.
<i>Candida shetae</i> 12878	Secc. Enol.
<i>Brettanomyces bruxellensis</i> 2121	Secc. Enol.
<i>Hanseniaspora vineae</i> AC 08 02/19 A	Secc. Enol.
<i>Hanseniaspora vineae</i> AC 08 02/25 A	Secc. Enol.
<i>Hanseniaspora vineae</i> AC 08 02/5 A	Secc. Enol.
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> 1206	Minho
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> 1265	Minho

(a) Secc. Enol.: Sección Enología Facultad de Química, UDELAR, Uruguay. Minho: Universidad de Minho, Braga-Portugal.

Medios y condiciones de cultivo

El medio de cultivo general utilizado para la conservación de las levaduras fue Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD; composición en Anexo). Este medio también fue utilizado como medio de cultivo no selectivo de referencia. Todas las

levaduras se mantuvieron en este medio en tubos de agar inclinado. La incubación se realizó a 25°C en estufa de cultivo durante 48 a 72 hs dependiendo de la cepa. Se utilizaron dos medios de cultivo selectivos y diferenciales para levaduras del genero *Zygosaccharomyces*: General *Z. bailii* Differential Médium (GZBD) y *Zygosaccharomyces bailii* and *bisporus* Differential Medium (ZBDM). El medio GZBD fue diseñado durante el desarrollo de este trabajo, basado en investigaciones previas (Schuller, Corte-Real et al. 2000)(Tabla II); y el medio ZBDM se fabricó según datos del equipo de la universidad de Minho que ha desarrollado su patente.

Tabla II. Composición final de los medios de cultivo selectivos y diferenciales para *Z. bailii*: GZBD* y ZBDM".

Medio Base	GZBD	ZBDM
(NH ₄)SO ₄	-	0,5 % p/v
Peptona	10 g/L	-
KH ₂ PO ₄	-	0,5 % p/v
K ₂ HPO ₄	0,1143% p/v	-
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,1232% p/v	0,05 % p/v
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,044% p/v	0,013 % p/v
Verde bromocresol	0,005% p/v	0,005 % p/v
Agar	2,5% p/v	2 % p/v
Glucosa	0,1% p/v	0,1 % p/v
Acido Fórmico	0,4% v/v	0,4 % v/v
Vitaminas	mg/L	mg/L
Biotina	0,125	0,005
Ca-pantotenate	1	0,4
Mioinositol	100	20
Niacina	2	0,8
Pyridoxina hidrocloreto	2	0,8
Tiamina hidrocloreto	0,5	0,8
PABA-K	0,2	-
Riboflavina	0,2	-
Ácido Fólico	0,2	-
Elementos Traza	µg/L	µg/L
MnCl ₂	200	400
ZnCl ₂	135	400
FeCl ₂	30	200
CuCl ₂	15	400
H ₃ BO ₃	5	500
Co(NO ₃) ₂ . 2H ₂ O	30	-
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	25	200
KClO ₃	10	-
KI	-	100

pH = 4,5

*GZBD fue diseñado en este trabajo según Schuller et. al. (2000).
 "ZBDM es el medio para detección de *Z. bailii* y *Z. bisporus* patentado de origen Portugués.

Las sales (macroelementos), el agar y el verde bromocresol, se disolvieron en 4/5 de agua destilada del volumen final y se ajustó el pH a 4,5. Se esterilizó a 121°C en autoclave, durante 15 minutos. Aparte se disolvieron la glucosa, el ácido fórmico y los elementos traza en un volumen de agua destilada un poco menor a 1/5 del volumen de medio a preparar. Se llevó el pH alrededor de 4,5, se agregaron las vitaminas y ajustó por último el pH a 4,5. La esterilización se realizó mediante filtración por membrana de 0,2 µm. Las dos preparaciones complementarias anteriores estériles, se termostataron a 50°C en baño de agua, se mezclaron y se repartieron en placas de Petri con un volumen de 30 mL por placa.

I - Evaluación del medio de cultivo diseñado GZBD

Con la finalidad de confirmar que el medio de cultivo GZBD es adecuado para la detección de *Z. bailii* se realizaron tres ensayos.

I a - Siembra en superficie de diluciones seriadas de 2 cepas de *Z. bailii*

Se evaluó el tiempo y límite de detección de *Z. bailii* mediante la siembra en la superficie del medio de cultivo selectivo y diferencial diseñado GZBD de diluciones seriadas de cultivos puros de las dos cepas de *Z. bailii*.

Se inocularon 2 matraces con medio de cultivo líquido YEPD, con dos cultivos puros de las cepas *Z. bailii* (1265 y 1206) por separado. Se incubó en agitador orbital durante 24 hs a 28°C y 100 RPM. Se determinó la cantidad de levaduras presentes mediante recuento en Cámara de Neubauer y se realizaron diluciones seriadas con suero fisiológico estéril. Se realizaron siembras en superficie por duplicado, tanto en el medio GZBD como en el medio YEPD. Se sembraron para *Z. bailii* 1265, 70 y 700 células, y para *Z. bailii* 1206, 100 y 1000 células. Los medios de cultivo GZBD y YEPD fueron incubadas en estufa a 25°C durante 10 días. Las características de las colonias desarrolladas y el viraje del indicador de pH fueron observados diariamente. Una vez estabilizado el número de colonias se calcularon los porcentajes de recuperación utilizando como referencia el medio no selectivo.

I b - Siembra mediante estría de levaduras no pertenecientes al género *Zygosaccharomyces*

Se evaluó la respuesta de las levaduras no pertenecientes al género *Zygosaccharomyces* comúnmente encontradas en el entorno microbiológico vitivinícola, para determinar sus potenciales como falsos positivos. Se sembraron 16 cepas de levaduras no pertenecientes al género *Zygosaccharomyces* y dos cepas de *Z. bailii* como control (Tabla I) mediante estrías en placas GZBD y en YEPD. Se incubó en estufa a 25°C durante 10 días y se observó diariamente el crecimiento y coloración de las colonias así como el viraje del indicador de pH del medio.

I c - Aplicación de la técnica de filtración por membrana

Mediante la técnica de filtración por membrana de 0.45 micras y posterior incubación de la misma en el medio GZBD, se evaluó el porcentaje de recuperación, tiempo de viraje del indicador de pH, la morfología y el tiempo que toma la coloración celeste de las colonias de *Z. bailii* mediante esta técnica. Se evaluó también mediante esta técnica el “carácter” de falsos positivos de las levaduras que en el ensayo Ib fueron consideradas “posibles falsos positivos”.

Se generaron cultivos líquidos puros en YEPD a 25°C, para las levaduras a ensayar, como se describe en el ensayo Ia. Se filtraron por duplicado diluciones seriadas de cada cultivo a través de membranas de nitrocelulosa estériles de 0,45 µm de poro (Sartorius Cat. 11406-47-ACN) mediante un equipo de filtración manual (Sartorius Cat. 16510) y una bomba de vacío también manual (NALGENE™ Cat. 6130-0010). El número de células filtradas según los cálculos de dilución, estuvieron entre 55-300 células por placa según la cepa. Se agregó 50 mL de suero fisiológico estéril al volumen de dilución a filtrar para generar una distribución uniforme de las levaduras presentes sobre la membrana. Se inocularon las membranas sobre la superficie de los medios de cultivo GZBD e YEPD y se incubaron a 25°C durante 11 días.

Las levaduras ensayadas fueron las cepas *Z. bailii* 1206, *Z. bailii* 1265, *S. cerevisiae* OC2 y cinco levaduras que a raíz de los resultados del ensayo Ib fueron consideradas “posibles falsos positivos” debido al color de su biomasa y/o el viraje del indicador ácido/base del medio, estas fueron: *T. delbrueckii*, *C. railensis*, *C. shetae*, *P. stipitis* R30, *P. stipitis* 7124.

II - Comparación del desempeño de los medios GZBD y ZBDM mediante la técnica de filtración

Se realizaron dos ensayos para comparar el desempeño del medio tentativo GZBD con el del ZBDM patentado, mediante la aplicación de la técnica de filtración por membrana detallada en el ensayo Ic.

II a - ZBDM vs GZBD con cepas *Z. bailii*

Se utilizaron cultivos puros de las dos cepas *Z. bailii*. La metodología utilizada fue la misma que en el ensayo Ic, se sembró por duplicado en los medios ZBDM, GZBD e YEPD. El número de células filtradas según los cálculos de las diluciones, fue de 250 para *Z. bailii* 1206 y de 230 para *Z. bailii* 1265. El objetivo de este ensayo fue comparar los tiempos de viraje del indicador, recuperaciones y tiempo de coloración de las colonias en simultáneo para los dos medios diferenciales estudiados.

II b - *T. delbrueckii*, *C. railensis* y *P. stipitis* R30 en ZBDM

Mediante la misma técnica se testearon también 3 cepas de levaduras que según los resultados del ensayo Ic presentan características de desarrollo en el medio GZBD que las hace interesantes de ensayar en el medio ZBDM patentado con el fin de conocer cómo se desarrollan en él. Las levaduras ensayadas fueron: *T. delbrueckii*, *C. railensis* y *P. stipitis* R30; como control negativo se ensayó la levadura *S. cerevisiae* OC2. Se analizó por duplicado en los medios ZBDM y YEPD. El número de células filtradas según los cálculos de diluciones fue de: 116 para *P. stipitis* R30, 390 para *C. railensis*, 195 para *S. cerevisiae* OC2 y 300 para *T. delbrueckii*.

III - Búsqueda de *Z. bailii* y *Z. bisporus* en bodegas del Uruguay mediante la utilización de ZBDM

Muestreo de bodegas del Uruguay

Se muestrearon un total de 87 vinos, pertenecientes a 17 bodegas del Uruguay, ubicadas en zonas enológicas estratégicas de los departamentos de Canelones (7 bodegas), Montevideo (3 bodegas), Colonia (2 bodegas), Soriano (1 bodega), Maldonado (1 bodega), Artigas (1 bodega) y Salto (2 bodegas) (Figura I). Para la identificación de las muestras, se le asignó a cada bodega un código que permitió darle objetividad al ensayo, así como mantener la confidencialidad de su origen. Dicho código corresponde al nombre del departamento donde se ubica la bodega seguido de un número secuencial arbitrario, por ejemplo: "Canelones 5".

Para cada bodega se muestrearon un promedio de 3 a 6 vinos, de diferentes variedades y años de cosecha. Esto permitió cubrir un espectro amplio de tipos de vinos diferentes. El volumen total de cada muestra fue de 750 mL.

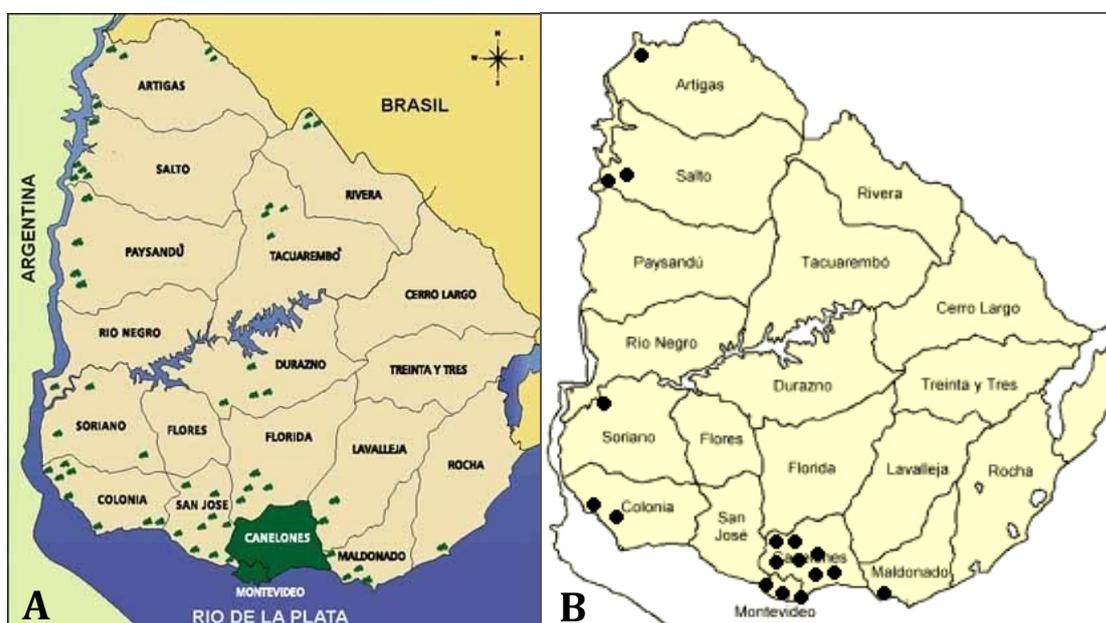


Figura I. A: Mapa vitícola del Uruguay (gentileza de INAVI), en verde se señalizan las regiones vitícolas. B: Localización aproximada de las 17 bodegas analizadas, cada punto corresponde a una bodega muestreada.

Información recopilada de los vinos muestreados

Para todos los vinos muestreados se solicitó información de año de cosecha, variedad de uva y datos fisicoquímicos básicos de control enológico (grado alcohólico, acidez total, acidez volátil, pH, anhídrido sulfuroso y azúcares reductores).

Análisis de muestras de vino mediante la técnica de filtración por membrana y siembra en el medio ZBDM

Las muestras fueron analizadas para determinar la presencia de *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* mediante la técnica de filtración por membrana de 0,45 µm anteriormente detallada y posterior incubación por duplicado en ZBDM y en YEPD (control no selectivo). El volumen de vino a filtrar se optimizó de acuerdo a los resultados obtenidos. Este fue de 50 y 250 mL, dichos volúmenes se analizaron en simultáneo, las cuatro membranas fueron incubadas en ZBDM. Otros 50 mL de muestra fueron filtrados por duplicado y las membranas se inocularon en YEPD.

En todos los casos la incubación se realizó a 30°C, por un período que osciló entre los 5-11 días según las colonias desarrolladas. Se realizó recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), y se observaron sus colores y características morfológicas. También se observó la alcalinización del medio y el correspondiente viraje del indicador del medio con el transcurso de los días. Según los parámetros anteriores se estableció la presencia o ausencia de *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* en la muestra y su concentración. Los resultados fueron confirmados mediante la observación de los preparados frescos de las colonias de *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* al microscopio óptico (Olimpus CO11) para detectar la presencia de ascosporas y pseudohifas características del género *Zygoaccharomyces*. Se tomaron fotografías para registrar la morfología de las colonias y las estructuras microscópicas observadas.

Análisis estadístico de los resultados

Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico de cluster mediante el software STATISTICA. Con el fin de evaluar si vinos parecidos tienen mayor incidencia de contaminación por *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* y que características de éstos son relevantes, todos los vinos analizados para los cuales

se contó con los datos de control enológico relevantes fueron incluidos en un análisis de conglomerado de K medidas. Quedaron excluidos de este análisis las bodegas “Soriano 1”, “Salto 1”, “Salto 2” y “Artigas 1”, por no contar con los datos fisicoquímicos requeridos.

RESULTADOS

I – Evaluación del medio de cultivo diseñado GZBD

I a - Siembra en superficie de diluciones seriadas de 2 cepas de *Z. bailii*

Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron recuperaciones promedio de 83 % para la cepa 1206 y 79 % para la cepa 1265. El desarrollo de colonias celestes-azules circulares opacas junto con el cambio de color del medio de verde a azul debido a su alcalinización toma 3 días para la cepa 1206 cuando se desarrollan 394 UFC promedio y 5 días para la cepa 1265 cuando se desarrollan más de 334 UFC promedio por placa. Cuando se desarrollan 52 UFC promedio por placa de *Z. bailii* 1206 toma 4 días y toma 10 días para la cepa 1265 cuando se desarrollan 26 UFC promedio por placa (Figura II, Tabla III).

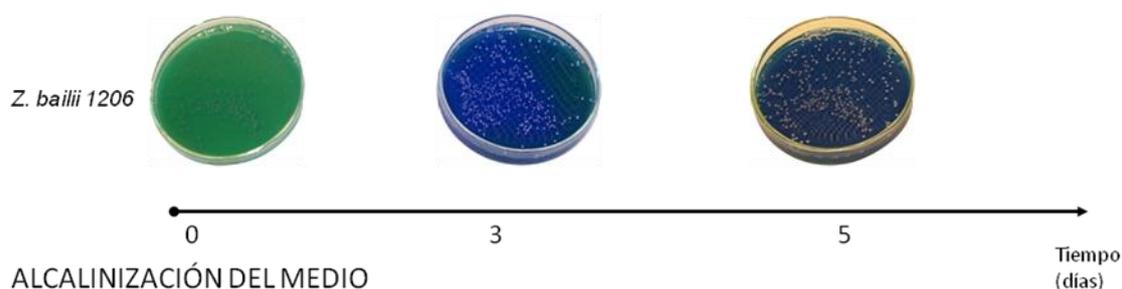


Figura II. Fotografías del ensayo de siembra en superficie de *Z. bailii* 1206 sobre el medio GZBD, tomadas al día 1, 3 y 5 de incubación respectivamente. Se observa la progresiva alcalinización del medio y viraje del indicador de pH de verde a azul.

Tabla III. Siembras en superficie del medio GZBD de las dos cepas de *Z. bailii*.

Cepa	UFC promedio	Recuperación (N/N' x 100)*	Tiempo de viraje del indicador (días)
<i>Z. bailii</i> 1206	394	70,6	3
<i>Z. bailii</i> 1206	52	95,0	4
<i>Z. bailii</i> 1265	334	93,5	5
<i>Z. bailii</i> 1265	24	65,3	10

*N/N' = UFC desarrolladas en GZBD/UFC desarrolladas en YEPD.

I b - Siembra mediante estría de levaduras no pertenecientes al género *Zygosaccharomyces*

Mediante esta técnica se detectó que cinco de las dieciséis levaduras no pertenecientes al género *Zygosaccharomyces* ensayadas al igual que *Z. bailii* viran el indicador de pH del medio de verde a azul, ellas son *Torulasporea delbrueckii* 1550, *Pichia stipitis* R30, *Pichia stipitis* 7124, *Candida railensis* 00/22 y *Candida shetae* 12878 (Tabla IV, Figura III) y por lo tanto son consideradas “posibles falsos positivos” en la detección de *Z. bailii* y *Z. bisporus* mediante la utilización de GZBD.

Tabla IV. Siembra mediante estrías en el medio GZBD y YEPD de cepas no pertenecientes al género *Zygosaccharomyces* y de *Z. bailii*.

Cepa	Desarrollo en YEPD	Desarrollo en GZBD	Desarrollo + viraje del indicador de pH en GZBD
<i>M. pulcherrima</i> 00/19	+	-	-
<i>I. terrícola</i> 06/21	+	-	-
<i>S. Pombe</i>	+	+/-	-
<i>K. fragilis</i>	+	+/-	-
<i>T. delbrueckii</i> 1550	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i> OC2	+	+	-
<i>S. bayanus</i>	+	-	-
<i>P. stipitis</i> R30	+	+	+
<i>P. stipitis</i> 7124	+	+	+
<i>C. flavescens</i> 00/7	+	-	-
<i>C. railensis</i> 00/22	+	+	+
<i>C. shetae</i> 12878	+	+	+
<i>B. bruxelliensis</i> 2121	+	-	-
<i>H. vineae</i> AC 08 02/19 A	+	+	-
<i>H. vineae</i> AC 08 02/25 A	+	+	-
<i>H. vineae</i> AC 08 02/5 A	+	+	-
<i>Z. bailii</i> 1206	+	+	+
<i>Z. bailii</i> 1265	+	+	+



Figura III. Fotografías de siembra mediante estría en medio GZBD. A: *Z. bailii* 1265, B: *T. delbrueckii* 1550, C: *H. vineae* AC 08 02/5 A y D: *P. stipitis* 7124. Se observan diferentes grados de viraje del indicador de pH del medio, *H. vineae* no alcaliniza el medio y por lo tanto no vira el color del medio a azul.

I c - Aplicación de la técnica de filtración por membrana

Mediante la filtración e incubación en GZBD de suspensiones de levaduras se pudieron conocer las recuperaciones, el tiempo de viraje del indicador de pH, la morfología y la coloración de las colonias desarrolladas tanto por *Z. bailii* como por las cinco levaduras que fueron consideradas como “posibles falsos positivos” en el ensayo Ib. Las recuperaciones obtenidas fueron las siguientes: 76% para *Z. bailii* 1206, 90% para *Z. bailii* 1265, 14% para *S. cerevisiae*, 10% para *T. delbrueckii*, 8,5% para *C. railensis*, 5% para *C. shetae*, 25% para *P. stipitis* R30 y 0,6% para *P. stipitis* 7124. Las cepas que viraron el indicador de pH del medio fueron cuatro: *Z. bailii* 1206 al quinto día de incubación, *Z. bailii* 1265 al séptimo día, *C. railensis* al sexto día y *P. stipitis* R30 al quinto día (Tabla V, Figura IV). La morfología de las colonias desarrolladas por *Z. bailii* fue idéntica para las dos cepas, por otro lado *C. railensis* y *P. stipitis* R30 se desarrollaron en colonias rugosas y aplanadas respectivamente, y fueron fácilmente distinguibles entre si y de las de *Z. bailii* debido a sus diferencias morfológicas (Fig. V).

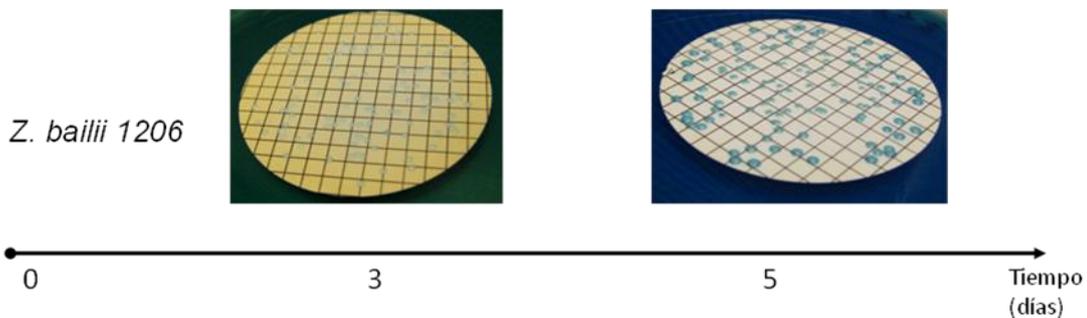


Figura IV. Técnica de filtración e incubación de membrana en GZBD. Fotografías de las membranas en el ensayo con *Z. bailii* 1206 al tercer y quinto día de incubación. Se observa la alcalinización del medio y la coloración y morfología de las colonias desarrolladas.

Tabla V. Técnica de filtración y siembra en GZBD.

Cepa	UFC promedio	Recuperación (N/N'x100)*	Viraje del indicador de GZBD	Tiempo de viraje del indicador de GZBD (días)
<i>Z. bailii</i> 1206	73	76	+	5
<i>Z. bailii</i> 1265	78	90	+	7
<i>S. cerevisiae</i>	6	14	-	-
<i>T. delbrueckii</i>	28	10	-	-
<i>C. railensis</i>	20	8.5	+	6
<i>C. shetae</i>	2	5	-	-
<i>P. stipitis</i> R30	42	25	+	5
<i>P. stipitis</i> 7124	1	0.6	-	-

*N/N'= UFC desarrolladas en GZBD/UFC desarrolladas en YEPD.

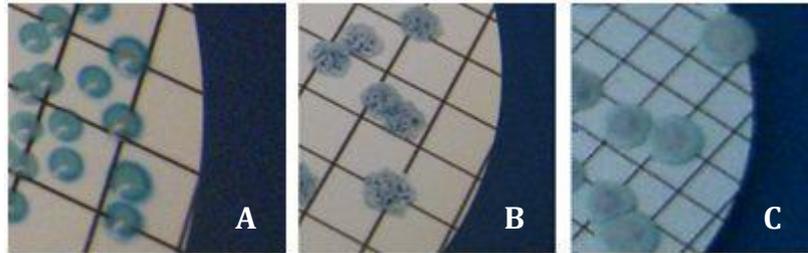


Figura V. Fotografía de colonias desarrolladas mediante la técnica de filtración e incubación de membrana. A: *Z. bailii* 1265; B: *C. raiiensis*; C: *P. stipitis* R30.

II - Comparación del desempeño de los medios GZBD y ZBDM mediante la técnica de filtración

II a - ZBDM vs GZBD con cepas *Z. bailii*

En este ensayo se compararon los porcentajes de recuperación, tiempo de viraje del indicador de pH y tiempo de coloración celeste-azulada de las colonias desarrolladas por las cepas de *Z. bailii* en el medio GZBD desarrollado y el medio ZBDM patentado. Los porcentajes de recuperación promedio en el medio GZBD son 75% para la cepa 1265 y 97% para la cepa 1206, para el medio ZBDM estos valores son 85% y 95,5% para ambas cepas respectivamente. La cepa *Z. bailii* 1206 presentó recuperaciones muy superiores a la cepa 1265 en ambos medios de cultivo. Los tiempos de viraje del indicador fueron de 6 días para la cepa 1265 en ambos medios cuando se desarrollan en el orden de las 100 UFC, y 4 días para la cepa 1206 en ambos medios cuando se desarrollan en el orden de 250 colonias. La coloración celeste azulada de las colonias toma 2 días más en GZBD que en ZBDM para la cepa *Z. bailii* 1206, para la cepa *Z. bailii* 1265 este tiempo fue igual en ambos medios de cultivo. (Tabla VI).

Tabla VI. Ensayo por técnica de filtración y siembra de membrana en los medios de cultivo GZBD y ZBDM para las cepas 1265 y 1206 de *Z. bailii*.

	<i>Z. bailii</i> 1265 en ZBDM	<i>Z. bailii</i> 1265 en GZBD	<i>Z. bailii</i> 1206 en ZBDM	<i>Z. bailii</i> 1206 en GZBD
Tiempo de viraje del indicador (días)	6	6	4	4
Tiempo de coloración de las colonias (días)	6	8	5	5
Recuperación (N/N'x100)*	85	75	95,5	97
Colonias desarrolladas promedio (UFC/placa)	118	104	256	259

Tiempo de viraje del indicador de pH (días), tiempo que toma en aparecer la coloración celeste azulada de las colonias (días) y porcentaje de recuperación de *Z. bailii* en relación al medio control YEPD.

*N/N'= UFC desarrolladas en el medio selectivo/UFC desarrolladas YEPD.

II b - *T. delbrueckii*, *C. railensis* y *P. stipitis* R30 en ZBDM

Los resultados de la técnica de filtración e incubación en ZBDM de las levaduras *T. delbrueckii*, *C. railensis* y *P. stipitis* R30 no fueron iguales a los obtenidos mediante la misma técnica en el medio GZBD (Experimento I, Ensayo Ic). En el medio ZBDM *T. delbrueckii* y *P. stipitis* R30 no se desarrollaron, al igual que el control negativo *S. cerevisiae*. *C. railensis* 00/22 se desarrolló con un porcentaje de recuperación del 8,5%, no viró el medio de cultivo, la morfología de las colonias fue rugosa y su color verde petróleo oscuro (Tabla VII).

Tabla VII. Técnica de filtración e incubación de membranas en ZBDM para las levaduras *T. d. 1550*, *S. c. OC2*, *P. stipitis* R30 y *C. railensis* 00/22.

Cepa	UFC promedio	Recuperación (N/N'x100)	Viraje del indicador de pH	Morfología de las colonias
<i>T. delbrueckii</i> 1550	0	<0,5	-	No se desarrollaron
<i>S. cerevisiae</i> OC2	0	<0,5	-	No se desarrollaron
<i>P. stipitis</i> R30	0	<2,6	-	No se desarrollaron
<i>C. railensis</i> 00/22	26	8,5	-	Rugosas color verde petróleo oscuro

Tiempo de viraje del indicador de pH (días), recuperación de *Z. bailii* en relación al medio control YEPD (N/N'x100), y morfología de las colonias en caso de desarrollarse.

*N/N'= UFC desarrolladas en el medio selectivo/UFC desarrolladas YEPD.

III - Búsqueda de *Z. bailii* y *Z. bisporus* en bodegas del Uruguay

Análisis de muestras de vino mediante la técnica de filtración por membrana e incubación en medio ZBDM selectivo y diferencial para *Z. bailii* y *Z. bisporus*

En cinco de las diecisiete bodegas relevadas se detectó la presencia de *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* en al menos uno de los vinos muestreados, lo cual corresponde al 29,4% de estas. Dichas bodegas se ubican en los departamentos de Artigas, Maldonado y Canelones (Figura VI); y fueron las codificadas para su identificación en este trabajo como: “Canelones 1”, “Canelones 2”, “Canelones 7”, “Artigas 1” y “Maldonado 1”.

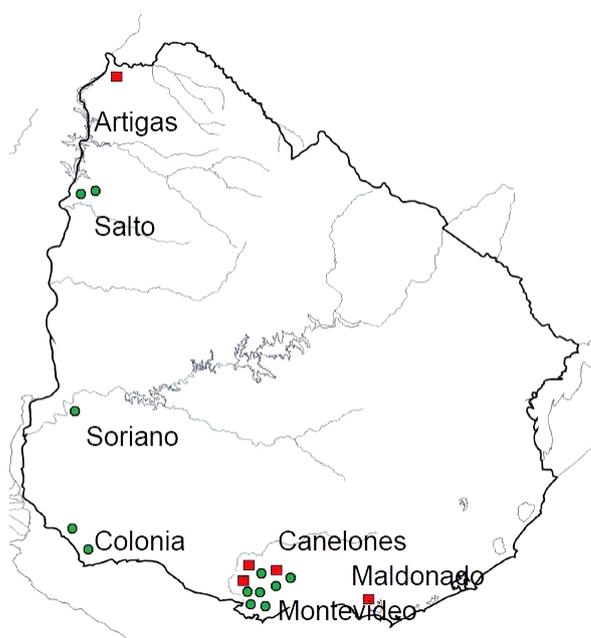


Figura VI. Localización aproximada de las 17 bodegas analizadas y resultados para sondeo de la presencia de *Z. bailii* y *Z. bisporus* en vinos. Cada cuadrado rojo corresponde a una bodega donde al menos uno de los vinos muestreados presentó contaminación por *Z. bailii* y/o *Z. bisporus*, y cada círculo verde una bodega para la cual no se detectó contaminación en ninguno de los vinos analizados.

En la bodega “Canelones 1” se detectó la presencia de $5,9 \times 10^3$ UFC/L de *Z. bailii* / *bisporus* en 1 de los 4 vinos muestreados, este fue un vino Tannat de la vendimia 2008. En la bodega “Canelones 2”, se detectó $2,2 \times 10^4$ UFC/L de *Z. bailii* / *bisporus* en de 1 de los 5 vinos muestreados, un vino tinto de corte 2009. En la bodega “Canelones 7”, se detectó la presencia de *Z. bailii* / *bisporus* en 2 de los 6 vinos muestreados, $1,2 \times 10^3$ UFC/L en un vino Arirarnoa 2008 y $7,5 \times 10^2$ UFC/L en un

vino Merlot 2009. En la bodega “Maldonado 1”, 1 de los 6 vinos muestreados presentó contaminación, este fue un vino Tannat 2009 y se detectó *Z. bailii* / *bisporus* en $2,4 \times 10^2$ UFC/L. Por último en la bodega “Artigas 1”, se detectó contaminación por *Z. bailii* / *bisporus* en una concentración de $5,2 \times 10^1$ UFC/L en 1 de los 6 vinos muestreados, un vino blanco de corte 2009 (Figura VII, Figura VIII y Tabla VIII). En total se detectó la presencia de *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* en 6 de los 87 vinos analizados, por lo tanto el porcentaje de vinos contaminados fue del 6,9%. El color azul del medio de cultivo ZBDM (alcalinizado) y las colonias celestes-azuladas desarrolladas en el análisis de los vinos contaminados se pueden observar en la Figura VII. Al microscopio óptico se observaron en ellas las características morfológicas (ascoesporas y pseudohifas) esperadas para levaduras del género *Zygosaccharomyces* (Figura VIII).

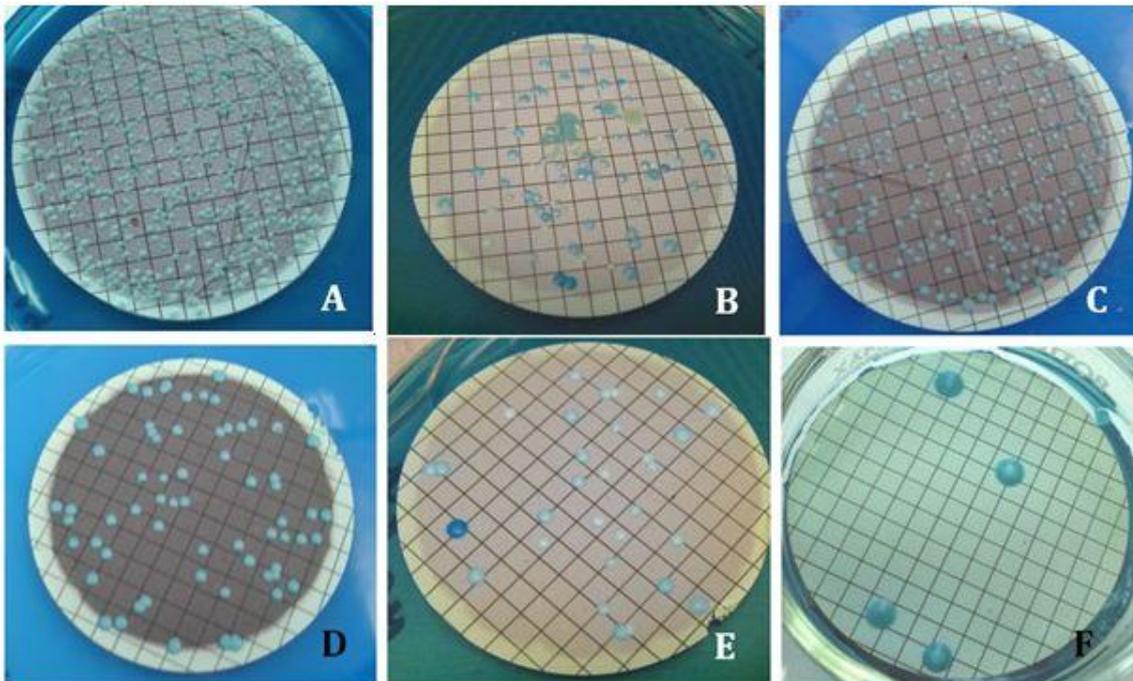


Figura VII. Análisis de vinos mediante filtración e incubación de membrana en medio ZBDM. Fotografías del análisis de los vinos en los cuales se detecto presencia de *Z. bailii* y/o *Z. bisporus*. **A:** “Maldonado 1” vino Tannat 2009, **B:** “Canelones 2” vino tinto de corte 2009, **C:** “Canelones 7” vino arirarñoa 2008, **D:** “Canelones 7” vino merlot 2009, **E:** “Canelones 1” vino Tannat 2008, **F:** “Artigas 1” vino blanco de corte 2009.

Información recopilada de los vinos muestreados

La cantidad de datos fisicoquímicos de control enológico recopilados de cada bodega no fue el mismo para todos los establecimientos muestreados (algunas bodegas suministraron los datos, mientras que otras no lo hicieron). En trece de

las diecisiete bodegas se pudieron recoger los siguientes datos: grado alcohólico, azúcares reductores, pH, anhídrido sulfuroso molecular, acidez total y acidez volátil. En las bodegas “Soriano 1” y “Salto 1” no se contó con los datos de pH ni de anhídrido sulfuroso molecular. En la bodega “Salto 2”, tampoco se contó con los datos de pH, anhídrido sulfuroso molecular ni azúcares reductores. Por último en la bodega “Artigas 1”, se contó únicamente con los datos de anhídrido sulfuroso libre, azúcares reductores y acidez total.

A modo general se observa que los datos fisicoquímicos recogidos para todos los vinos estudiados se encontraron dentro de rangos bastante amplios: grado alcohólico entre 10,50 y 15,90 % con un valor promedio y desvío estándar de 13,05 % V/V \pm 1,02; azúcares reductores entre 1,1 y 65 g/L, promedio 4,54 g/L \pm 10,75; pH entre 3,04 y 3,86, promedio 3,55 \pm 0,20; anhídrido sulfuroso molecular entre 0,28 y 2,52 mg/L, promedio de 0,78 mg/L \pm 0,39; acidez total entre 3,2 y 5,1 g H₂SO₄/L, promedio de 3,88 g H₂SO₄/L \pm 0,43 y acidez volátil entre 0,16 y 0,85 g H₂SO₄/L con un valor promedio de 0,48 g H₂SO₄/L \pm 0,14.

Los vinos contaminados presentaron los siguientes valores promedio en sus características de control enológico: 0,54 mg/L \pm 0,09 de SO₂ molecular, pH= 3,67 \pm 0,04, Etanol 12,68 % V/V \pm 1,39, acidez total 3,70 g H₂SO₄/L \pm 0,40 g/L, acidez volátil 0,50 g H₂SO₄/L \pm 0,06 y 5,92 g/L \pm 9,37 de azúcares reductores. La población de levaduras detectada y los datos fisicoquímicos recopilados para cada uno de los vinos contaminados se pueden observar en la Tabla VIII. Mediante la ilustración 3D de los datos fisicoquímicos todos los vinos analizados se pudo observar una tendencia a que los vinos contaminados posean alto pH y bajo anhídrido sulfuroso molecular en relación al resto de los vinos que no presentaron contaminación, dicha tendencia se puede observar en representación 3D de los datos de pH, acidez total y anhídrido sulfuroso molecular (Figura IX).

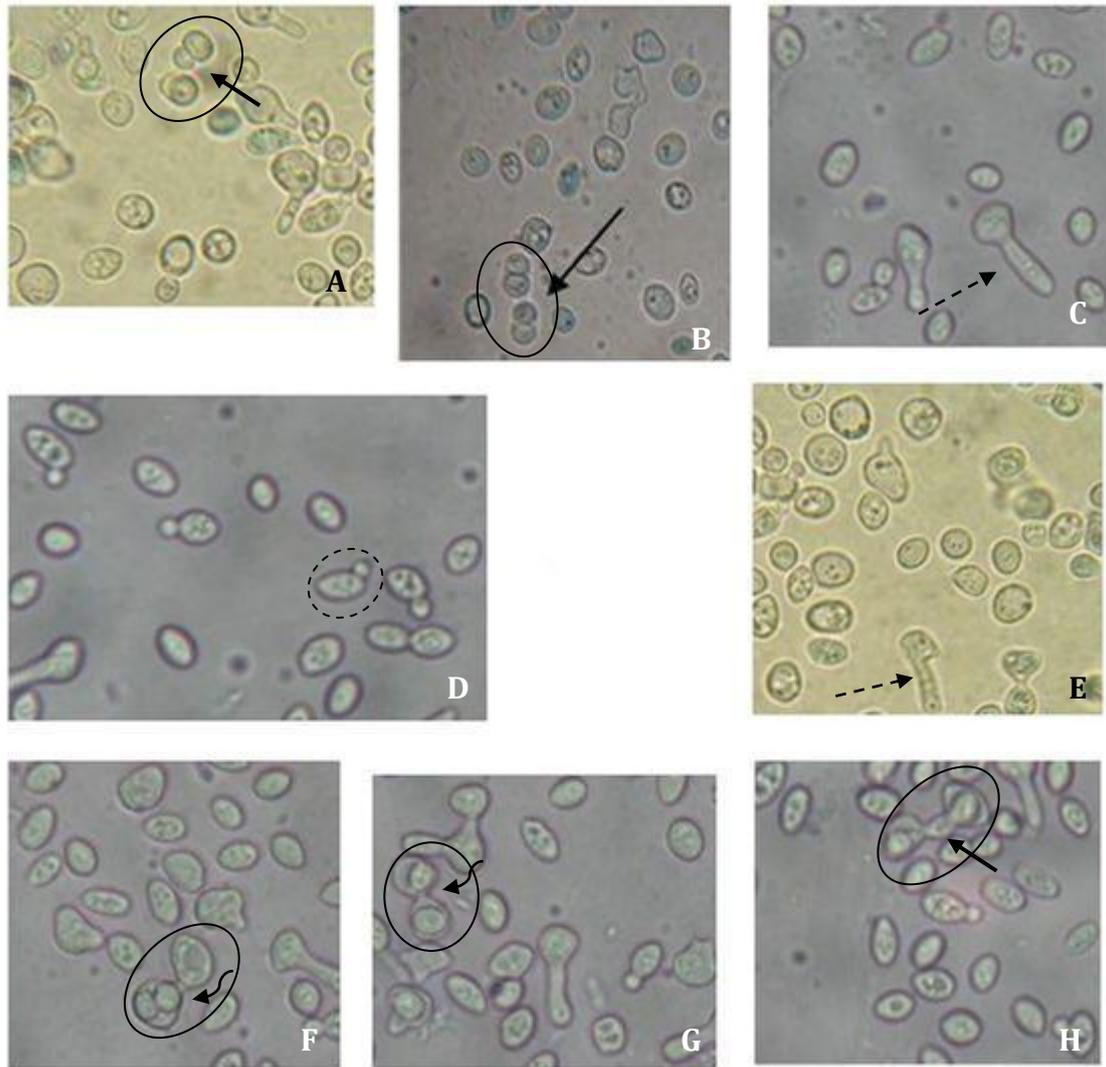


Figura VIII. Fotografías microscópicas de *Zygosaccharomyces* (1000X). Los preparados frescos fueron realizados a partir de las colonias desarrolladas en el análisis de los vinos mediante la técnica de filtración e incubación de membrana sobre ZBDM. A, B, H: con flechas se señalizan las ascosporas características de del género *Zygosaccharomyces* las cuales aparecen aproximadamente a los 10 días de incubación en ZBDM; C, E: con flechas punteadas se señalizas las pseudohifas características de las cepas de este género; D: dentro de un elipse se señaliza la gemación multipolar; F, G: con flechas curvas se señalizan las estructuras de conjugación.

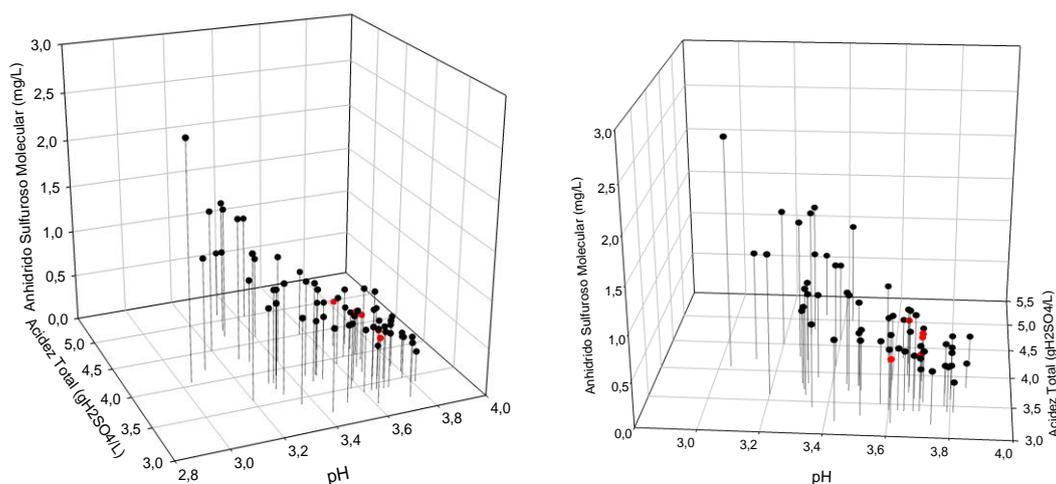


Figura IX. Grafico 3D visualizado desde dos perspectivas diferentes. Anhídrido sulfuroso molecular (mg/L), pH y Acidez total (g/L) de 62 de los vinos analizados. Los vinos que presentaron contaminación por *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* se señalizan con punto color rojo en el gráfico y los no contaminados con color negro.

Tabla VIII. Datos fisicoquímicos de control enológico recogidos para cada uno de los vinos que presentaron contaminación por *Z. bailii* y/o *bisporus* y resultado de la población de dichas levaduras.

Bodega	Vino	UFC/L de <i>Z. bailii</i> y/o <i>bisporus</i>	Grado alcohólico (%V/V)	pH	Anhídrido sulfuroso molecular (mg/L)	Azúcares reductores (g/L)	Acidez total (g H ₂ SO ₄ /L)	Acidez volátil (g H ₂ SO ₄ /L)
Canelones 1	Tannat 2008	5,9 x 10 ³	12,60	3,61	0,70	2,30	3,20	0,48
Canelones 2	Tinto 2009	2,2 x x 10 ⁴	10,50	3,70	0,50	25,00	3,90	0,45
Canelones 7	Arinarnoa 2008	1,15 x 10 ³	12,70	3,65	0,50	1,90	4,20	0,57
Canelones 7	Merlot 2009	7,5 x 10 ²	13,30	3,70	0,48	1,30	4,00	0,56
Maldonado 1	Tannat 2009	2,40 x 10 ²	14,30	3,70	0,50	2,00	3,60	0,45
Artigas 1	Blanco Corte 2009	5,2 x 10 ¹	ND	ND	ND	3,00	3,30	ND

Análisis Estadístico

Mediante los análisis de conglomerado de K medidas, incluyendo como variables el pH, el anhídrido sulfuroso molecular y la acidez total (estandarizadas) los vinos analizados fueron separados en 3 grupos (Clusters) homogéneos y significativamente diferentes entre sí ($F > 32,6$ para las tres variables, $p = 0,000000$ para las tres variables con $\alpha = 0,05$) (Figura X, Tablas A1, A2 y A3 del Anexo). Se observó que los vinos con contaminación por *Z. bailii* y/o *bisporus* se encontraron todos dentro del Cluster N°2 que se diferencia por presentar altos valores de pH y bajo contenido de anhídrido sulfuroso molecular (Figura X, Tablas A1, A2 y A3 del Anexo).

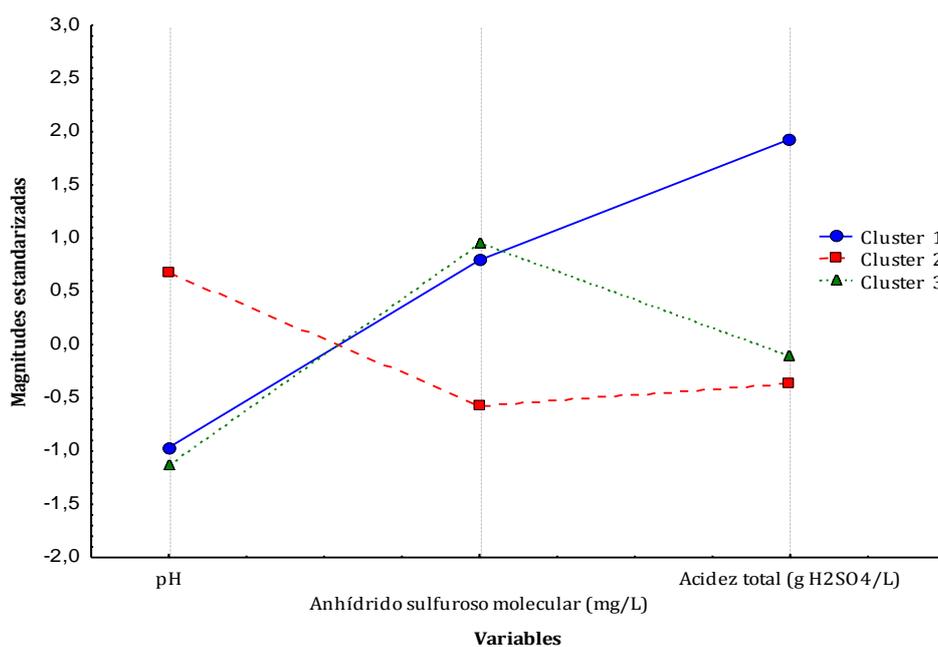


Figura X. Análisis de Cluster - conglomerado de K medidas. Gráfico comparativo de las medias de las variables estandarizadas: pH, Anhídrido sulfuroso molecular (mg/L) y Acidez total (g H₂SO₄/L). En cuadrados rojos con línea cortada se grafican los valores del Cluster 2, en círculos azules con línea continua los valores del Cluster 1 y en triángulos verdes con líneas punteadas los valores del Cluster 3.

DISCUSIÓN

I - Evaluación del medio de cultivo diseñado GZBD

Los resultados obtenidos en los ensayos mediante siembra en superficie de *Z. bailii* mostraron muy buenas recuperaciones en relación al medio no selectivo YEPD (promedio 81%), por lo cual el medio diseñado cumple este primer requisito indispensable para ser utilizado como método de detección.

Por otro lado, mediante este ensayo se observó como varía el tiempo de detección (viraje de color del medio y el desarrollo de coloración de las colonias) según el orden de UFC desarrolladas. Para aproximadamente 350 UFC/placa (promedio), el tiempo de detección toma entre 3 y 5 días según la cepa. Para un orden de diez menos, aproximadamente 38 UFC/placa (promedio), toma entre 4 y 10 días según la cepa (Figura II, Tabla III). Estos resultados muestran la dependencia con respecto a la carga microbiana que presenta esta metodología como método de detección de *Z. bailii*, y la variación en los tiempos de detección según la cepa. Debido a que no se obtuvo el mismo número de UFC por placa para las dos cepas no se pueden concluir comparaciones entre ellas.

En el ensayo de siembra mediante estrías en GZBD de levaduras no pertenecientes al género *Zygosaccharomyces* se detectó que cinco levaduras viran el indicador de pH del medio de verde a azul al igual que *Z. bailii* (*T. delbrueckii* 1550, *P. stipitis* R30, *P. stipitis* 7124, *C. railensis* 00/22 y *C. shetae* 12878, (Tabla IV, Figura III) y por lo tanto fueron consideradas “posibles falsos positivos” en la detección de *Z. bailii* y *Z. bisporus* mediante la utilización del medio GZBD. Como ya se comentó anteriormente las levaduras de los géneros *Pichia* y *Candida* son consideradas levaduras oportunistas capaces de alterar vinos cuando ocurre algún error de producción o debido a pobres niveles de higiene y GMP's, por otro lado algunas cepas de *T. delbrueckii* son capaces de generar un considerable deterioro en ciertas condiciones, por lo cual esta especie es considerada con alto potencial contaminante (Loureiro and Malfeito-Ferreira 2003). Los resultados de este ensayo fueron tomados como una aproximación a la detección de falsos positivos

debido a que en éste solo se consideró el viraje de color del medio y no la morfología y coloración de las colonias. Debido a que las estrías no fueron sembradas con una cantidad idéntica de biomasa para las diferentes levaduras ensayadas, no deben inferirse resultados comparativos entre ellas.

La utilización de la metodología de filtración de suspensiones de levaduras e incubación de las membranas en el medio GZBD permitió conocer el desempeño del medio mediante esta técnica de común utilización para el análisis microbiológico de bebidas. Los resultados obtenidos fueron promisorios. Se ensayaron tanto las cepas de *Z. bailii* como las cinco levaduras que fueron consideradas “posibles falsos positivos” en el ensayo de siembra mediante estría. Las recuperaciones obtenidas para las cepas de *Z. bailii* fueron muy buenas, en promedio 83% lo cual confirma que usando el medio diseñado mediante la técnica de filtración por membrana se logra una buena recuperación de *Z. bailii* (Tabla V, Figura IV). El tiempo de detección de *Z. bailii* mediante esta metodología fue entre 5 y 7 días según la cepa cuando se desarrollaron valores similares de UFC por placa para ambas cepas, 73 y 78, para la cepa 1206 y 1265 respectivamente. Al igual que en el ensayo de siembra en superficie se observó que la cepa 1206 se detecta más rápidamente que la cepa 1265. Por otro lado de las cinco levaduras consideradas “posibles falsos positivos” sólo viraron el color del medio *C. railensis* y *P. stipitis* R30 (Tabla V, Figura IV), a pesar de ello, debido a que la morfología de sus colonias fue fácilmente distinguible de las de *Z. bailii* por ser estas rugosas y aplanadas respectivamente, se descartó la posibilidad de que constituyan falsos positivos en la detección de *Z. bailii* (Fig. V). El resto de las cepas no pertenecientes al género *Zygosaccharomyces* ensayadas no mostraron mediante esta técnica potencial como falsos positivos ya que todas ellas se desarrollaron con bajo porcentaje de recuperación (0,6 - 14%) y no viraron el indicador de pH del medio de verde a azul. Dado que el número de células filtradas fue variable entre las diferentes levaduras ensayadas, no deben compararse los resultados entre ellas ya que las condiciones no fueron idénticas.

II - Comparación del desempeño de los medios GZBD y ZBDM mediante la técnica de filtración

Los resultados obtenidos en la comparación de los medio GZBD y ZBDM mediante la técnica de filtración e incubación, mostraron que las recuperaciones de *Z. bailii* son comparables, no existiendo una diferencia importante entre ambos medios. Los tiempos de viraje del color no variaron según el medio utilizado por lo cual, también en este aspecto, los medios no presentan diferencias. Por otro lado se observó que la coloración celeste azulada de las colonias si varió según el medio utilizado, toma 2 días más en GZBD que en ZBDM para la cepa *Z. bailii* 1206, para *Z. bailii* 1265 este tiempo fue igual en ambos medios de cultivo (Tabla VI). Según los resultados anteriores la detección de *Z. bailii* es más temprana mediante la utilización del medio ZBDM para una de las dos cepas ensayadas lo cual constituye una ventaja sobre el medio GZBD diseñado.

El porcentaje de recuperación es de 65% para *Z. bailii* IGC 4806 en el medio patentado ZBDM según lo reportado previamente (Schuller, Corte-Real et al. 2000), en el presente trabajo las recuperaciones obtenidas para *Z. bailii* mediante la misma técnica de filtración fueron muy superiores, entre 85-95,5% según la cepa. Esta diferencia podría ser explicada debido a la variabilidad entre cepas en cuanto a su capacidad para desarrollarse en dicho medio selectivo y diferencial ó también puede deberse a que en el presente trabajo se utilizó suero fisiológico en vez de agua destilada des-ionizada para las diluciones seriadas. Es posible que la utilización de agua destilada des-ionizada haya generado la muerte de parte de las levaduras.

Los ensayos realizados mediante la técnica de filtración e incubación para las levaduras *T. delbrueckii*, *P. stipitis* R30 y *C. railensis* en el medio ZBDM mostraron que en este medio *T. delbrueckii* y *P. stipitis* R30 no se desarrollan, al igual que el control negativo *S. cerevisiae*. *C. railensis* 00/22 presentó un porcentaje de recuperación muy bajo igual al desarrollado en GZBD (Experimento I, Ensayo Ic), del 8,5%, pero en ZBDM no viró el color del medio a azul, la morfología y color de sus colonias también fueron fácilmente diferenciables de las de *Z. bailii* (Tabla VII).

Según los resultados obtenidos el medio de cultivo ZBDM presentó importantes ventajas con respecto al medio diseñado GZBD, por el hecho de no permitir el desarrollo cepas presentes en bodega como *T. delbrueckii*, *P. stipitis* R30 y *S. cerevisiae* y porque en este la cepa *C. railensis* 00/22 no es capaz de alcalinizar el medio.

Por las ventajas observadas para el medio ZBDM este será el medio de cultivo seleccionado para la búsqueda de *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* en vinos Uruguayos.

III- Búsqueda de *Z. bailii* y *Z. bisporus* en bodegas del Uruguay mediante la utilización de ZBDM

Las bodegas muestreadas representaron aproximadamente el 6,6 % del total de bodegas del País. El 29,4 % de las mismas, presentó contaminación por *Z. bailii* y/o *Z. bisporus*. A su vez, el 80% de las bodegas contaminadas, estuvieron ubicadas en la región sur y sureste de Uruguay, concretamente en los departamentos de Canelones y Maldonado. Allí se encuentra la mayor densidad de establecimientos vitivinícolas del país y en el caso de este trabajo de investigación, el 64,7 % de las bodegas relevadas se ubicaron en dicha región (Figura VI). La elección de las bodegas a muestrear, así como el muestreo de los vinos se realizó teniendo en cuenta la mayor diversidad posible de muestras de vino del Uruguay. Lamentablemente, algunas de las bodegas preseleccionadas para este trabajo no acompañaron el desarrollo de este trabajo, por lo que no suministraron muestras, y esto implicó que no fuera posible la realización de un muestreo estadístico más riguroso.

La mayoría de los establecimientos muestreados se destacaron por la alta calidad de sus vinos y/o el volumen de producción, 3 de las 5 bodegas que presentaron contaminación estuvieron dentro de este grupo.

El 7% de los vinos analizados presentó contaminación por *Z. bailii* y/o *Z. bisporus*, lo cual permite inferir que los vinos Uruguayos son susceptibles a ser contaminados.

La contaminación por *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* dentro de cada bodega no fue generalizada sino puntual, en 1 ó 2 vinos de los 4 a 6 muestreados por bodega. Esto

podría reflejar el hecho de que *Z. bailii* y *Z. bisporus* no resista las características fisicoquímicas de todos los vinos ó también podría ser un indicio de buena higiene y desinfección en las instalaciones lo que evita la contaminación cruzada, logrando así que *Z. bailii* y *Z. bisporus* no colonicen otros vinos. Las poblaciones de *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* encontradas en los vinos contaminados variaron entre 52 UFC/L a $2,2 \times 10^4$ UFC/L (Tabla VIII). Dichas concentraciones han sido consideradas por varios autores más que suficientes para representar una gran amenaza a la estabilidad del vino y causar su deterioro (Loureiro and Malfeito-Ferreira 2003; Fugelsang and Edwards 2007; Pitt and Hocking 2009).

Teniendo en cuenta las características fisicoquímicas de los vinos que presentaron contaminación por *Z. bailii* y/o *Z. bisporus*, encontramos que todas las cepas presentes fueron resistentes a graduaciones alcohólicas iguales ó superiores a 10,5 % V/V y algunas de ellas a una graduación máxima de 14,3 % V/V de etanol. En cuanto a la resistencia al anhídrido sulfuroso, todas las cepas detectadas fueron resistentes a 0,48 mg/L de anhídrido sulfuroso molecular. Uno de los vinos contaminados presentó 0,7 mg/L de SO₂ molecular, por lo que las cepas presentes fueron resistentes a esta concentración. Un dato importante a destacar es que *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* se desarrollaron con niveles de azúcares residuales mínimos (1,3-3 mg/L) en 5 de los 6 vinos contaminados (Tabla. VIII). Esto confirmó que estas cepas constituyen un peligroso contaminante también para vinos secos.

En relación a los datos de resistencia a etanol, pH y sulfitos reportados en la bibliografía para *Z. bailii*, podemos notar que los valores de etanol en los que se encontraron las cepas de detectadas fueron intermedios a los reportados, que oscilan entre 10 y 20 % v/v de etanol (Fugelsang and Edwards 2007; Martorell, Stratford et al. 2007).

En lo que respecta a los valores de pH, los vinos contaminados fueron todos superiores al pH límite hasta ahora reportado que puede soportar *Z. bailii* (de 2 a 2,2).

Por último, los niveles de SO₂ en los que se encontraban las cepas halladas fueron muy inferiores a las resistencias reportados de 2-3 mg/L de SO₂ molecular. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, no se constató una alta resistencia a sulfitos por parte de las levaduras estudiadas (Jermini and Schmidt-

Lorenz 1987; Pilkington and Rose 1988; Fugelsang and Edwards 2007; Martorell, Stratford et al. 2007; Pitt and Hocking 2009)

Se observó que existe una tendencia a que los vinos contaminados presenten un pH elevado y una concentración de anhídrido sulfuroso molecular menor en relación a la mayoría del resto de los vinos no contaminados (Fig. IX). Esta tendencia fue analizada en más profundidad a través del análisis estadístico de cluster - conglomerado de K medidas. Este confirmó que las cepas de *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* se encontraron en vinos pertenecientes al cluster 2, que se agruparon por poseer pH relativamente alto y valores de anhídrido sulfuroso molecular relativamente bajo con respecto a los vinos pertenecientes a otros Clusters (Fig. X). En este Cluster 2 se agrupó el 61% de los vinos muestreados, dentro de los cuales en el 13% se detectó *Z. bailii* y/o *Z. bisporus*. Estos resultados evidencian que el contenido de SO₂ molecular se encuentra relacionado con la presencia de *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* en los vinos contaminados, y por lo tanto la concentración de este conservante en vinos parecería ser determinante en el desarrollo de dichas levaduras. Dado que los vinos contaminados se encontraron dentro del cluster que agrupó mayor cantidad de vinos (el 61% del total), es claro que los vinos contaminados no fueron vinos con características especiales o diferentes dentro de la población de muestras analizadas. Estos fueron vinos “comunes” en cuanto al pH, contenido de SO₂ molecular y acidez total.

Llama la atención que solo el 13% de los vinos del cluster 2 presentaron contaminación por *Z. bailii* y/o *Z. bisporus*, ya que todos los vinos de este cluster comparten importantes características: alto pH, bajos niveles de SO₂ molecular y bajos niveles de acidez total. Teniendo en cuenta además que la contaminación dentro de cada bodega fue puntual y no generalizada (como ya se comentó), es posible que no haya existido una contaminación cruzada que extienda la contaminación entre vinos susceptibles a ser contaminados debido a sus características fisicoquímicas. Dado que el origen de dichas levaduras son principalmente las uvas dañadas, si las instalaciones son higienizadas y desinfectadas cuidadosamente y no existe contaminación cruzada, solo los vinos producidos con alta proporción de uvas dañadas, que a su vez presenten

características fisicoquímicas que posibiliten su desarrollo, estarían contaminados con *Z. bailii* y/o *Z. bisporus*.

Por otro lado el hecho que la presencia de *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* haya coincidido con vinos de bajos niveles de SO₂ y alto pH, hace pensar que estas cepas no se habrían desarrollado si el contenido de conservante hubiera sido mayor y que por lo tanto las cepas encontradas serían de fácil control y aún no se habrían adaptado a los niveles extremos de conservantes reportados en la bibliografía. Estas hipótesis serían interesantes de evaluar y quedan para futuras investigaciones.

Aumentar los niveles de SO₂ para mantener la protección del conservante sería el primer intento de controlar de las cepas de *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* encontradas. Las concentraciones de SO₂ molecular necesarias para controlar cepas de *Z. bailii* son muy variables dentro de la bibliografía y esto se debe en parte a que diferentes cepas de la misma especie no poseen resistencias similares. Se encuentra reportada la existencia de una alta variabilidad dentro de levaduras *Z. bailii* y *Z. bisporus* en cuanto a resistencia al SO₂, solo 16% de las cepas aisladas de mostos presentaron alta resistencias de 3,1 - 4,7 mg/L de SO₂ molecular (ensayos en medio YPD pH=3) y la mayoría resistieron 1, 5mg/L (Domizio, Romani et al. 2011). Dado que el pH promedio de los vinos contaminados fue 3,67±0,04 el nivel de SO₂ libre a mantener para superar los 1,5 mg/L del conservante en su forma molecular estaría en el entorno de 85 mg/L, dichas concentraciones de SO₂ son altas y afectarían de forma muy negativa las características organolépticas de los vinos, además posiblemente no serían posibles de obtener sin superar los límites permitidos de sulfitos totales en vino.

Según los datos obtenidos en la presente trabajo, los niveles de conservante utilizados en Uruguay oscilan entre 0,3-2,5 mg/L de SO₂ molecular, con un promedio de 0,8±0,4 mg/L. Estos valores son bastante variables entre distintos vinos como se observa en el desvío estándar. Las referencias bibliográficas indican, que en la práctica muchos productores de vino intentan mantener 0.4 a 0.6 mg/L de SO₂ molecular para controlar el desarrollo de las levaduras deterioradoras durante el envejecimiento del vino (Fugelsang and Edwards 2007), por lo cual los valores encontrados en los vinos uruguayos se encuentran dentro de lo habitual, (con unos pocos casos que se alejan de este rango). Como ya se ha mencionado,

sería necesaria una concentración mínima de 1,5-2 mg/L de SO₂ molecular para inhibir cepas de *Z. bailii* y *Z. bisporus* (Domizio, Romani et al. 2011). Teniendo en cuenta que el pH de los vinos uruguayos analizados se encontró entre 3,04 y 3,85 (con un promedio de 3,55±0,2), los niveles de SO₂ libre que deberían mantenerse en vinos para prevenir el posible desarrollo de *Z. bailii* y *Z. bisporus* estarían entre 22-130 mg/L. Estos resultados muestran que la utilización del anhídrido sulfuroso no es suficiente para inhibir el crecimiento de *Z. bailii* y *Z. bisporus* en vinos con pH elevado, por los motivos ya comentados. Por esta razón resulta fundamental contar con indicadores microbiológicos que den cuenta de su presencia; y en caso de sospecha de contaminación definir adecuadamente el tipo de vinificación a utilizar. Por otro lado, la utilización de DMDC, es otra de las herramientas a tener presentes para controlar y prevenir el desarrollo de estas levaduras deterioradoras.

Tomando en cuenta que se detectaron únicamente 6 vinos contaminados con *Z. bailii* y/o *Z. bisporus*, es importante considerar que el SO₂ y el DMDC producen la muerte de las levaduras *Z. bailii* y también la entrada parcial de estas en un estado viable pero no cultivable (VBNC) (Divol and Lonvaud-Funel 2005). En estado VBNC las levaduras en general no son recuperadas mediante la metodología de cultivo. Es posible entonces que la frecuencia de contaminación que reportamos aquí subestime la presencia de *Z. bailii* y *Z. bisporus* en vinos Uruguayos.

CONCLUSIONES

La presente investigación confirma la contaminación por *Z. bailii* y/o *Z. bisporus* en vinos Uruguayos.

Las poblaciones detectadas estuvieron en todos los casos dentro de lo reportado como muy riesgoso para la estabilidad del vino. Debido a esto, la utilización de ZBDM debería ser incorporada como indicador de calidad microbiológica en la producción de vinos a fin de prevenir el desarrollo de *Z. bailii* y *Z. bisporus* y el consiguiente deterioro de estos.

Asimismo, el cuidado de la salud de las uvas (integridad de los granos), y el uso del DMDC como complemento al SO₂, son las herramientas a tener en cuenta para controlar la contaminación.

Dado que todos los vinos contaminados presentaron bajos niveles de SO₂ molecular, se plantea la hipótesis de que las cepas presentes en ellos no serían altamente resistentes a sulfitos y sería posible su control aumentando los niveles de sulfitación.

PERSPECTIVAS

Este trabajo deja planteados varias interrogantes y temas interesantes a investigar a futuro:

Identificación molecular de levaduras *Z. bailii* y *Z. bisporus* aisladas de vino o mosto mediante el uso de ZBDM como forma de reconfirmar la especificidad de sus propiedades diferenciales.

Estudio de la presencia de de *Z. bailii* y *Z. bisporus* en uvas sanas y uvas dañadas y su biodiversidad.

Análisis de la resistencia de cepas *Zygosaccharomyces* nativas de uvas o vinos a sulfitos y a DMDC en un medio similar vino a diferentes valores de pH, y la variabilidad en dichas resistencias entre cepas nativas Uruguayas.

ANEXO

Composición Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD)

10 g/L Extracto de Levadura

10 g/L Peptona

20 g/L Dextrosa

20 g/L Agar

Buffer Mc. Llaine pH 4,5: para preparar 1 L de buffer mezclar 450 mL de Na_2HPO_4 0,2M con 550 mL de Ácido Cítrico 0,1M.

Forma de preparación: Los nutrientes se disuelven en buffer Mc. Llaine pH 4,5, en un volumen igual o superior al 50% del volumen total de medio a preparar. El agar se suspende en un volumen de agua destilada inferior o igual al 50% del volumen de medio de cultivo a preparar. Luego de esterilizadas a 121°C en vapor durante 15 minutos las preparaciones anteriores se llevan a 50°C en baño de agua, se mezclan y se reparte el medio en tubos o placas de petri.

Composición Wallerstein Laboratory Nutrient (WLN)

50 g/L Dextrosa

5 g/L Tryptona

4 g/L Extracto de Levadura

0,55 g/L Fosfato de monopotasio

0,425 g/L Cloruro de Potasio

0,125 g/L de Cloruro de Calcio

0,125 g/L de Sulfato de Magnesio

0,022 g/L Verde de Bromocresol

0,0025 g/L Cloruro Férrico

0,0025 g/L Sulfato de Manganeseo

15 g/L Agar Bacteriológico

pH final $5,5 \pm 0,2$ a 25° C

Análisis de Cluster-Conglomerado de K medidas, datos adicionales de resultados: Tablas A1, A2 y A 3.

Tabla A1. Análisis de cluster-conglomerado de K medidas. Medias de las variables estandarizadas, pH, anhídrido sulfuroso molecular (mg/L) y acidez total (gH₂SO₄) para cada Cluster.

Variable estandarizada	Medias de los Clusters		
	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
pH	-0,966985	0,679578	-1,13050
Anhídrido sulfuroso molecular (mg/L)	0,793910	-0,569916	0,95659
Acidez total (gH ₂ SO ₄)	1,931417	-0,358776	-0,11362

Tabla A2. Análisis de cluster-conglomerado de K medidas. Distancias euclideas entre Clusters. Distancias debajo de la diagonal, y distancias al cuadrado por encima de la diagonal.

Distancias euclideas entre Clusters.			
Cluster N ^o	1	2	3
1	0,000000	3,272058	1,411788
2	1,808883	0,000000	1,888912
3	1,188187	1,374377	0,000000

Tabla A3. Análisis de cluster-conglomerado de K medidas. Análisis de Varianza para cada una de las variables.

Variable	Análisis de Varianza					
	Between SS	df	Within SS	df	F	signif. P
pH	45,47849	2	15,52151	59	86,43587	0,000000
Anhídrido sulfuroso molecular (mg/L)	32,02608	2	28,97392	59	32,60759	0,000000
Acidez total (gH ₂ SO ₄)	34,94088	2	26,05912	59	39,55452	0,000000

BIBLIOGRAFÍA

- BARATA, A., S. GONZALEZ, ET AL. (2008). "SOUR ROT-DAMAGED GRAPES ARE SOURCES OF WINE SPOILAGE YEASTS." FEMS YEAST RES **8**(7): 1008-1017.
- BARATA, A., M. MALFEITO-FERREIRA, ET AL. (2011). "THE MICROBIAL ECOLOGY OF WINE GRAPE BERRIES." INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, DOI: [10.1016/J.IJFOODMICRO.2011.11.025](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025).
- BARATA, A., F. SEBORRO, ET AL. (2008). "ASCOMYCETOUS YEAST SPECIES RECOVERED FROM GRAPES DAMAGED BY HONEYDEW AND SOUR ROT." JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY **104**: 1182-1191.
- BOIDO, E., A. LLORET, ET AL. (2003). "AROMA COMPOSITION OF VITIS VINIFERA CV. TANNAT: THE TYPICAL RED WINE FROM URUGUAY." J AGRIC FOOD CHEM **51**(18): 5408-5413.
- BOIDO, E., K. MEDINA, ET AL. (2009). "THE EFFECT OF BACTERIAL STRAIN AND AGING ON THE SECONDARY VOLATILE METABOLITES PRODUCED DURING MALOLACTIC FERMENTATION OF TANNAT RED WINE." J AGRIC FOOD CHEM **57**(14): 6271-6278.
- BRANDOLINI, V., G. SALZANO, ET AL. (2002). "AUTOMATED MULTIPLE DEVELOPMENT METHOD FOR DETERMINATION OF GLYCEROL PRODUCED BY WINE YEASTS." WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY **18**: 481-485.
- CARRAU, F. M., E. BOIDO, ET AL. (2011). VITIS VINIFERA TANNAT, CHEMICAL CHARACTERIZATION AND FUNCTIONAL PROPERTIES. TEN YEARS OF RESERCH. KERALA, INDIA, TRANSWORLD RESEARCH NETWORK 37/661 (2).
- CARRAU, F. M., K. MEDINA, ET AL. (2008). "PRODUCTION OF FERMENTATION AROMA COMPOUNDS BY SACCHAROMYCES CEREVISIAE WINE YEASTS: EFFECTS OF YEAST ASSIMILABLE NITROGEN ON TWO MODEL STRAINS." FEMS YEAST RES **8**(7): 1196-1207.
- DANG, T. D., A. VERMEULEN, ET AL. (2009). "A PECULIAR STIMULATORY EFFECT OF ACETIC AND LACTIC ACID ON GROWTH AND FERMENTATIVE METABOLISM OF ZYGOSACCHAROMYCES BAILII." FOOD MICROBIOL **26**(3): 320-327.
- DELFINI, C., P. GAIA, ET AL. (2002). "FERMENTABILITY OF GRAPE MUST AFTER INHIBITION WITH DIMETHYL DICARBONATE (DMDC)." J AGRIC FOOD CHEM **50**(20): 5605-5611.
- DI MARO, E., D. ERCOLINI, ET AL. (2007). "YEAST DYNAMICS DURING SPONTANEOUS WINE FERMENTATION OF THE CATALANESCA GRAPE." INT J FOOD MICROBIOL **117**(2): 201-210.
- DIVOL, B. AND A. LONVAUD-FUNEL (2005). "EVIDENCE FOR VIABLE BUT NONCULTURABLE YEASTS IN BOTRYTIS-AFFECTED WINE." J APPL MICROBIOL **99**(1): 85-93.

- DOMIZIO, P., C. ROMANI, ET AL. (2011). "OUTLINING A FUTURE FOR NON-SACCHAROMYCES YEASTS: SELECTION OF PUTATIVE SPOILAGE WINE STRAINS TO BE USED IN ASSOCIATION WITH SACCHAROMYCES CEREVISIAE FOR GRAPE JUICE FERMENTATION." INT J FOOD MICROBIOL **147**(3): 170-180.
- FERNANDES, L., M. CORTE-REAL, ET AL. (1997). "GLUCOSE RESPIRATION AND FERMENTATION IN ZYGOSACCHAROMYCES BAILII AND SACCHAROMYCES CEREVISIAE EXPRESS DIFFERENT SENSITIVITY PATTERNS TO ETHANOL AND ACETIC ACID." LETT APPL MICROBIOL **25**(4): 249-253.
- FERRARI, V. (2010). IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE CEPAS DE ASPERGILLUS PRODUCTORAS POTENCIALES DE OCRATOXINA A (OTA) EN UVAS Y VINOS DE VITIS VINÍFERA L. CV 'TANNAT'. DEFENSA INTERMEDIA DE MAESTRÍA, FACULTAD DE QUÍMICA-UDELAR.
- FLEET, G. (1992). "SPOILAGE YEASTS." CRIT REV BIOTECHNOL **12**(1-2): 1-44.
- FLEET, G. H. (2003). "YEAST INTERACTIONS AND WINE FLAVOUR." INT J FOOD MICROBIOL **86**(1-2): 11-22.
- FLEET, G. H. (2008). "WINE YEASTS FOR THE FUTURE." FEMS YEAST RES **8**(7): 979-995.
- FUGELANG, K. C. AND C. G. EDWARDS (2007). WINE MICROBIOLOGY
- IVEY, M. L. AND T. G. PHISTER (2011). "DETECTION AND IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS IN WINE: A REVIEW OF MOLECULAR TECHNIQUES." J IND MICROBIOL BIOTECHNOL **38**(10): 1619-1634.
- JAMES, S. A. AND M. STRATFORD (2003). "SPOILAGE YEASTS WITH EMPHASIS ON THE GENUS ZYGOSACCHAROMYCES." YEASTS IN FOOD. BEHR'S VERLAG: 171-191.
- JERMINI, M. F. G. AND W. SCHMIDT-LORENZ (1987). "CARDINAL TEMPERATURES FOR GROWTH OF OSMOTOLERANT YEASTS IN BROTHS AT DIFFERENT WATER ACTIVITY VALUES." JOURNAL OF FOOD PROTECTION **50**(6): 473-478.
- LOUREIRO, V. AND M. MALFEITO-FERREIRA (2003). "SPOILAGE YEASTS IN THE WINE INDUSTRY." INT J FOOD MICROBIOL **86**(1-2): 23-50.
- LOUREIRO, V. AND A. QUEROL (1999). "THE PREVALENCE AND CONTROL OF SPOILAGE YEASTS IN FOODS AND BEVERAGES." TRENDS IN FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY **10**: 1-10.
- MALFEITO-FERREIRA, M. (2011). "YEASTS AND WINE OFF-FLAVOURS: A TECHNOLOGICAL PERSPECTIVE." ANN MICROBIOL **61**: 95-102.
- MARTORELL, P., M. STRATFORD, ET AL. (2007). "PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SPOILAGE STRAINS OF ZYGOSACCHAROMYCES BAILII AND ZYGOSACCHAROMYCES ROUXII ISOLATED FROM HIGH SUGAR ENVIRONMENTS." INT J FOOD MICROBIOL **114**(2): 234-242.

- MEDINA, K., E. BOIDO, ET AL. (2005). "YEAST INTERACTIONS WITH ANTHOCYANINS DURING RED WINE FERMENTATION." AMERICAN JOURNAL OF ENOLOGY AND VITICULTURE **56**: 104-108.
- OIV (2012). RECUEIL DES METHODES INTERNATIONALES D'ANALYSE DES VINS ET DES MOUTS.
- PÉREZ, G., E. BOIDO, ET AL. (2010). "AQUIBRET": MEDIO SELECTIVO Y DIFERENCIAL PARA LA DETECCIÓN DE CONTAMINACIÓN POR *DEKKERA/BRETTANOMYCES* EN JUGOS DE UVA Y VINOS". FACULTAD DE QUÍMICA. URUGUAY.
- PEYNAUD, E. (1996). ENOLOGÍA PRÁCTICA, CONOCIMIENTO Y ELABORACIÓN DEL VINO. MADRID, ESPAÑA.
- PILKINGTON, B. J. AND A. H. ROSE (1988). "REACTIONS OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AND *ZYGOSACCHAROMYCES BAILII* TO SULPHITE." J GEN MICROBIOL **134**(10): 2823-2830.
- PITT, J. I. AND A. D. HOCKING (2009). FUNGI AND FOOD SPOILAGE, SPRINGER.
- RAWSTHORNE, H. AND T. G. PHISTER (2009). "DETECTION OF VIABLE *ZYGOSACCHAROMYCES BAILII* IN FRUIT JUICES USING ETHIDIUM MONOAZIDE BROMIDE AND REAL-TIME PCR." INT J FOOD MICROBIOL **131**(2-3): 246-250.
- RODRIGUES, F., M. CORTE-REAL, ET AL. (2001). "OXYGEN REQUIREMENTS OF THE FOOD SPOILAGE YEAST *ZYGOSACCHAROMYCES BAILII* IN SYNTHETIC AND COMPLEX MEDIA." APPL ENVIRON MICROBIOL **67**(5): 2123-2128.
- ROMANO, P., V. BRANDOLINI, ET AL. (1998). "THE PRODUCTION OF 2,3-BUTANEDIOL AS A DIFFERENTIATING CHARACTER IN WINE YEASTS." WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY **14**: 649-653.
- ROMANO, P., C. FIORE, ET AL. (2003). "FUNCTION OF YEAST SPECIES AND STRAINS IN WINE FLAVOUR." INT J FOOD MICROBIOL **86**(1-2): 169-180.
- ROMANO, P. AND G. SUZZI (1993). "HIGHER ALCOHOL AND ACETON PRODUCTION BY *ZYGOSACCHAROMYCES* WINE YEASTS." JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY **75**: 541-545.
- SCHULLER, D., M. CORTE-REAL, ET AL. (2000). "A DIFFERENTIAL MEDIUM FOR THE ENUMERATION OF THE SPOILAGE YEAST *ZYGOSACCHAROMYCES BAILII* IN WINE." J FOOD PROT **63**(11): 1570-1575.
- SOUSA-DIAS, S., T. GONCALVES, ET AL. (1996). "KINETICS AND REGULATION OF FRUCTOSE AND GLUCOSE TRANSPORT SYSTEMS ARE RESPONSIBLE FOR FRUCTOPHILY IN *ZYGOSACCHAROMYCES BAILII*." MICROBIOLOGY **142**: 1733-1738.
- SOUSA, M. J., L. MIRANDA, ET AL. (1996). "TRANSPORT OF ACETIC ACID IN *ZYGOSACCHAROMYCES BAILII*: EFFECTS OF ETHANOL AND THEIR IMPLICATIONS ON THE RESISTANCE OF THE YEAST TO ACIDIC ENVIRONMENTS." APPL ENVIRON MICROBIOL **62**(9): 3152-3157.

- SOUSA, M. J., F. RODRIGUES, ET AL. (1998). "MECHANISMS UNDERLYING THE TRANSPORT AND INTRACELLULAR METABOLISM OF ACETIC ACID IN THE PRESENCE OF GLUCOSE IN THE YEAST ZYGOSACCHAROMYCES BAILII." MICROBIOLOGY **144 (Pt 3)**: 665-670.
- THOMAS, D. S. AND R. R. DAVENPORT (1985). "ZYGOSACCCHAROMYCES BAILII- A PROFILE OF CHARACTERISTICS AND SPOILAGE ACTIVITIES." FOOD MICROBIOLOGY **2**: 157-169.
- TRISTEZZA, M., A. LOURENCO, ET AL. (2010). "SUSCEPTIBILITY OF WINE SPOILAGE YEASTS AND BACTERIA IN THE PLANKTONIC STATE AND IN BIOFILMS TO DISINFECTANTS." ANN MICROBIOL **60**: 549-556.
- VILELA-MOURA, A., D. SCHULLER, ET AL. (2008). "REDUCTION OF VOLATILE ACIDITY OF WINES BY SELECTED YEAST STRAINS." APPL MICROBIOL BIOTECHNOL **80(5)**: 881-890.