

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO para uso en enología:

Información necesaria para determinar los distintos niveles de prevención de los riesgos asociados al fenol

Cécile Oger-Duroy¹, Joana Coulon², Aline Lonvaud-Funel², Pierre Sonigo¹
¹ Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France / ² Microflora, ISVV, Bordeaux, France

Introducción

La prevención de los riesgos asociados al fenol es un importante desafío en enología. Los etilfenoles producidos por el hongo *Brettanomyces bruxellensis* son responsables de importantes pérdidas económicas.

La prevención de los riesgos asociados a los fenoles se ha convertido en una cuestión fundamental en el diagnóstico enológico. No todos los métodos de diagnóstico tienen el mismo campo de aplicación y sus rendimientos varían según el estado fisiológico de las células de *B. bruxellensis*. Las pruebas que aquí se presentan, realizadas en el contexto

de un estudio experimental sobre la estabilización microbiológica de los vinos, utilizan una cepa particularmente potente de *Brettanomyces bruxellensis* conocida por su resistencia a condiciones de estrés extremas. La epifluorescencia y el cultivo, aunque no específicos en condiciones normales de uso en este campo, se compararon aquí con la técnica de PCR, un método sumamente específico cuando se detecta la presencia conjunta de numerosas especies microbianas.

Estos elementos permitirían determinar, para cada método, las fases de vida celular que son accesibles

para diagnóstico y evaluar el riesgo relacionado con la presencia de *B. bruxellensis*. Se determinará el método más apto para prevenir los riesgos asociados al fenol.

Fases fisiológicas de la vida celular

Los métodos de diagnóstico disponibles actualmente no detectan todas las fases de vida celular. En una muestra de vino están presentes células en diferentes fases fisiológicas.

De acuerdo con la historia del vino y los tratamientos aplicados al mismo, la proporción de cada estado fisiológico de las células puede variar.

Células vivas
y cultivadas

Células vivas,
no cultivadas

Células
subletales

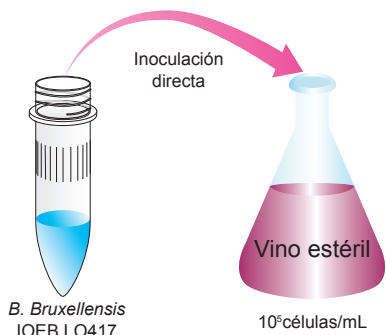
Células
muertas

Células muertas
y lisadas
(ADN libre)

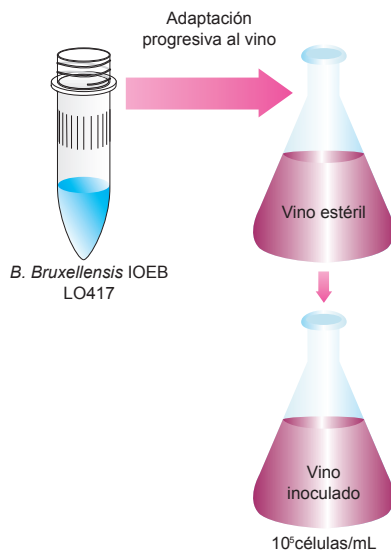
Material y Métodos

Protocolo experimental para la inoculación de vinos

1 - Inoculación abrupta



2 - Inoculación después de adaptación

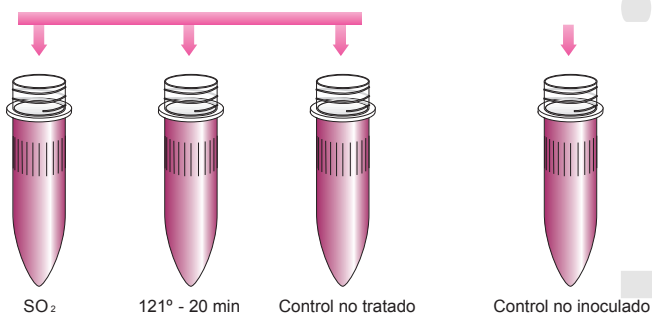


Análisis microbiológicos utilizados

- Q-PCR (Brettanomytest, Bio-Rad)
- Epifluorescencia
- Medio de cultivo sólido

Discusión y Resultados

Detección de *B. bruxellensis* inoculada abruptamente en vino estéril. Bajo condiciones de inoculación abrupta, las células de *B. bruxellensis* mueren instantáneamente porque no están habituadas o adaptadas a las adversas condiciones físico-químicas que encuentran en el vino (pH, contenido de alcohol, etc.). El vino contaminado por esta vía se analizó mediante cultivo, epifluorescencia y PCR.



Análisis después de 1, 5, 15 y 30 días de almacenamiento a 25°

	Epifluorescencia	Cultivo	PCR
Resultados en UFC/mL	ND	ND	ND

Estos resultados demostraron la importancia de la adaptación progresiva de las células de *Brettanomyces bruxellensis* al “medio ambiente del vino” bajo condiciones experimentales en el laboratorio. Con ninguno de los tres métodos se detectaron células muertas.

Detección de *B. bruxellensis* inoculada después de la adaptación en vino estéril

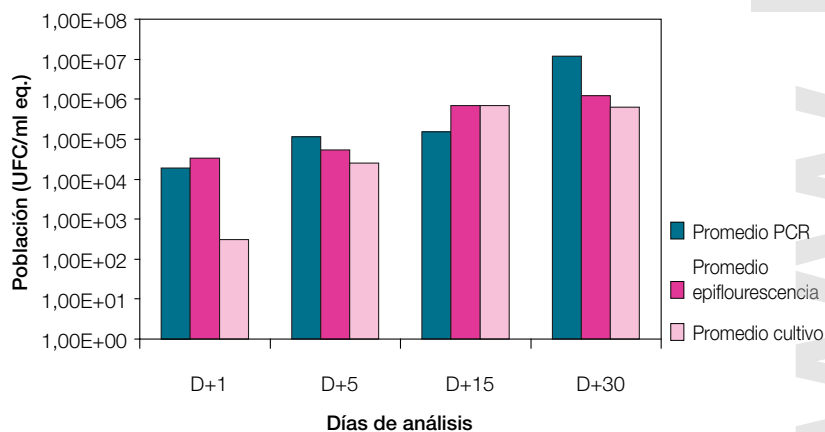
Tratamiento a 121°C durante 20 min.:

no se detectó ninguna célula con ningún método.

Control sin *B. bruxellensis*: no se detectó ninguna célula con ningún método.

- Sin tratamiento, se observó un intenso crecimiento.
- Después de la esterilización, no se detectaron células muertas.
- En estos dos ejemplos extremos se corroboraron los resultados para todos los métodos: Q-PCR, epifluorescencia y cultivo.

Figura 1: Control sin tratamiento



- El tratamiento con sulfitos limita el desarrollo celular.

- El conjunto es una forma no cultivable, pero que sigue siendo detectable con Q-PCR y epifluorescencia.

- Sólo con Q-PCR y epifluorescencia se detecta la presencia de microorganismos viables.

- Los niveles detectados con epifluorescencia y Q-PCR son similares.

¿Las células viables no detectadas en el cultivo pueden alterar al vino produciendo etilfenoles?

Figura 2: Tratamiento con SO₂ (160 mg/L)

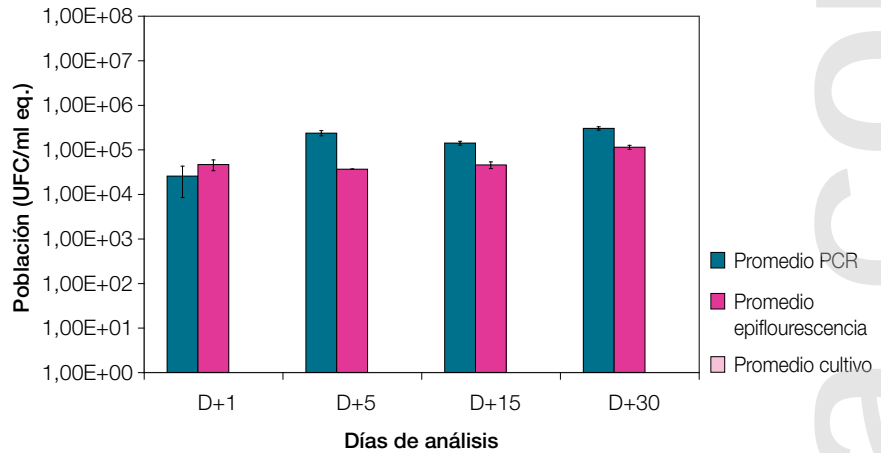
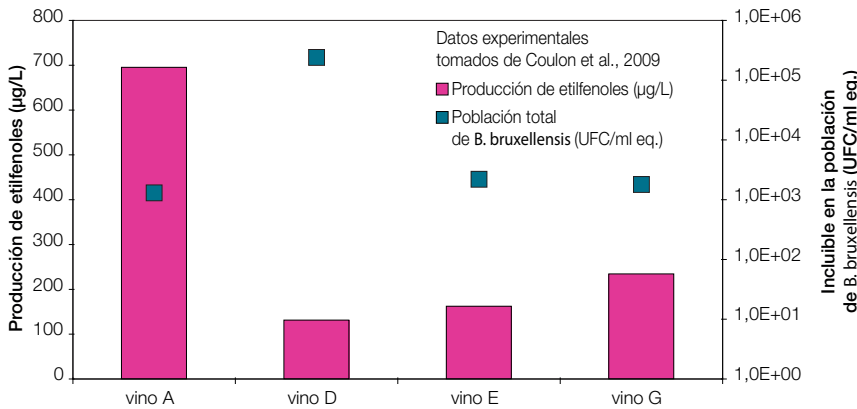


Fig. 3: Producción de etilfenoles en vinos contaminados naturalmente con B. bruxellensis (monitorizados durante 130 días)



- Poblaciones vivas de Brettanomyces bruxellensis presentes naturalmente en los vinos embotellados, no detectadas en el medio de cultivo pero detectadas con PCR, fueron observadas durante 130 días para determinar su capacidad para producir etilfenoles (Coulon et al., 2009).

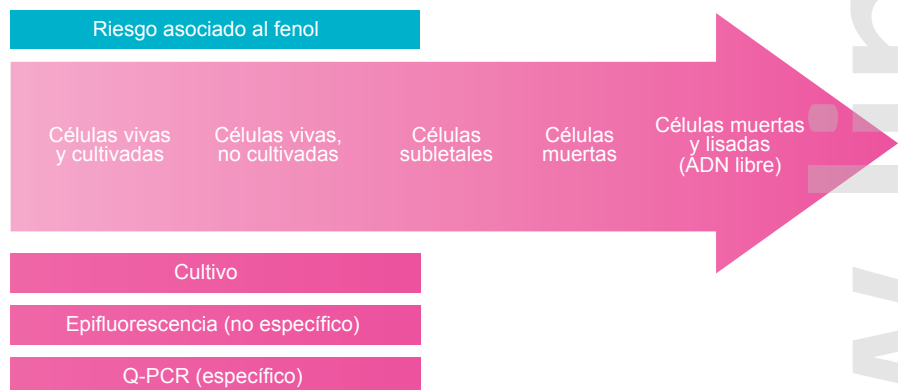
- A lo largo de la vida del vino se ha demostrado el riesgo de que el mismo resulte alterado por estas poblaciones vivas no cultivables, que sin embargo, son detectables con PCR.

Interpretación

Bajo nuestras condiciones experimentales, el tratamiento con sulfitos tuvo el efecto de estabilizante microbiológico sobre los vinos. De hecho, en D+30, las poblaciones tratadas son menos numerosas que las poblaciones no tratadas. Y no obstante estas células no están muertas, pues son detectadas más de una semana después del tratamiento.

Sin embargo, las células detectadas con PCR pero no detectadas en cultivos presentan riesgo de alteración del vino y son capaces de producir etilfenoles.

El Q-PCR puede detectar células viables que presentan riesgo de alteración del vino.



Métodos de diagnóstico: Evaluaciones

	Epifluorescencia	Cultivo	PCR
Población celular detectada	Citometría de flujo	Sólo las células cultivables	Todas las células vivas de <i>B. bruxellensis</i> responsables de los riesgos asociados al fenol
Objetivo del método	Todas las células vivas Detección de células vivas, cultivables y no cultivables	Detección de células vivas cultivables	Detección específica de células viables, cultivables y no cultivables
Comentarios	No específico Límite de detección insuficiente	No específico No es posible detectar la mayoría de las células (90%) que están vivas pero no son cultivables - riesgos asociados al fenol	Específico Sensible Apto para evaluar los riesgos asociados al fenol
Límite de detección	103 UFC/mL-1 2,102 UFC/mL-1	1 UFC/mL-1 (subestimación de la población total)	1 UFC/mL-1
Evaluación de riesgo	Subestimada (límite de detección) y no específica	Subestimada y no específica	Precisa, específica y sensible

Conclusión

La PCR Cuantitativa puede usarse para evaluar con precisión el riesgo asociado a la presencia de *B. bruxellensis* en los vinos. La Epifluorescencia es una herramienta pertinente para la viabilidad celular pero no es específica en condiciones de

campo, lo cual limita su uso en diagnósticos efectivos para la prevención de los riesgos asociados al fenol, como ocurre también con la citometría de flujo, que utiliza el mismo marcador. El debate respecto de la definición de células vivas y muertas debería superarse y pasar a

considerarse desde una perspectiva enológica en términos de capacidad de las células para alterar el vino y, por consiguiente, de los riesgos asociados al fenol. Las células vivas no cultivables son capaces de producir etilfenoles y se detectan con la Q-PCR.