

## MEDIOS SELECTIVO-DIFERENCIALES EN LA DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DE *Brettanomyces/Dekkera*.

Benito, S.; Palomero, F.; Morata, A.; Calderón, F.; González, M. C.; Suárez-Lepe, J. A.  
Dpto. Tecnología de Alimentos. ETS Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica  
de Madrid.

Ciudad Universitaria S/N. Madrid 28040. TF: 913365745

e-mail: [antonio.morata@upm.es](mailto:antonio.morata@upm.es)

### Resumen

Se han estudiado diferentes medios selectivos-diferenciales para detectar *Brettanomyces/Dekkera* analizando además comparativamente las ventajas e inconvenientes de los ya existentes. Los principales inconvenientes son los falsos positivos producidos por levaduras sin actividad vinilfenolreductasa, frecuentes contaminaciones por hongos oportunistas en medios sólidos y tiempos de espera para obtener resultados. Dichos medios se basan en peculiaridades fisiológicas de *Brettanomyces/Dekkera* (actividad vinilfenolreductasa, resistencia al etanol, desarrollo en anaerobiosis, generación de acidez volátil, resistencia a actidiona, asimilación de etanol, cinética de desarrollo,...), utilizando agentes selectivos (actidiona, cloramfenicol, anoxia, etanol, sorbato potásico) y diferenciales (ácido *p*-cumárico, verde de bromocresol, carbonato cálcico). De las levaduras estudiadas sólo los géneros *Dekkera/Brettanomyces*, *Pichia guilliermondi*, *Kloeckera apiculata*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida tropicalis* y algunas cepas de *Candida parapsilosis* son capaces de crecer en presencia de Actidiona. La utilización de ácido *p*-cumárico por *Dekkera/Brettanomyces* provoca la aparición de descriptores olfativos atribuidos al 4-etilfenol, permitiendo la detección de levaduras que presentan esta actividad enzimática entre posibles falsos positivos. La adición de verde de bromocresol distingue a las levaduras según su capacidad para generar ácido acético en función del viraje del medio. La presencia de azúcares acelera el desarrollo de *Brettanomyces/Dekkera* respecto de los medios que emplean etanol como única fuente de carbono, aunque disminuye la selectividad de estos. Los cultivos realizados en medios líquidos solucionan los problemas ocasionados por hongos oportunistas y permiten la cuantificación de etilfenoles por cromatografía. La especie dominante con actividad vinilfenol reductasa en los vinos contaminados estudiados ha sido *Dekkera bruxellensis*.

**Palabras clave:** *Brettanomyces/Dekkera*, factor selectivo-diferencial, falso positivo, actidiona, 4-etilfenol, ácido *p*-cumárico.

### 1. Introducción

Para la detección de *Brettanomyces/Dekkera* es preciso recurrir a factores selectivo-diferenciales, tales como los antibióticos actidiona (antifúngico) o cloramfenicol (antibacteriano) [1,2,4], ácido sórbico [2], fuentes de carbono selectivas como etanol [5] o maltosa, trealosa y sacarosa [2] y etanol como agente antimicrobiano [3], ya que su detección mediante medios de aislamiento convencionales resulta dificultosa debido a la menor velocidad de crecimiento y presencia poblacional respecto de otras especies de levaduras y hongos.

Los principales inconvenientes [Tabla1] de los medios empleados en la actualidad son los falsos positivos producidos por levaduras resistentes a actidiona [Fig.1.], el tiempo de obtención de resultados y las contaminaciones por hongos oportunistas [Fig.2.], especialmente en medios sólidos.

Tabla 1. Ventajas e inconvenientes de medios empleados en la actualidad

Medio	Factores selectivo-diferenciales	Ventajas	Inconvenientes	Mejoras
BSM [7] Sólido	Actidiona Cloramfenicol Clorotetraciclina Gentamicina	Relativamente rápido (5-8 días f(ufc/ml)).	No diferencial. Faltos positivos (Resistencia actidiona) Hongos (sólido)	Etanol (microbicida) Ácido p-cumárico Verde de Bromocresol Aplicación líquida
DBDM [5] Sólido Líquido	Actidiona Ácido p-cumárico Verde de Bromocresol Etanol (fuente de carbono) No hidratos de carbono	Medio más selectivo. (Dekkera/Brettanomyces, Pichia Guillermondi) Importancia ecológica (Aislamiento de cepas)	Muy lento (>15 días) (aplicación industrial) Hongos (sólido) Pichia Guillermondi	Cloramfenicol Hidratos de carbono (velocidad)
[6] Líquido	Actidiona. Cloramfenicol Ácido p-cumárico	Relativamente rápido (4-6 días f(ufc/ml)). Menor importancia por falsos positivos (líquido, p-cumárico)	No cuantifica directamente. No medio aislamiento.	Etanol (microbicida) Verde de Bromocresol
DHSA [2]	Actidiona, penicilina, gentamicina Etanol (microbicida) Trealosa, Sacarosa Ácido sórbico Verde de Bromocresol Nutrientes.	Relativamente rápido (5-8 días f(ufc/ml)).	Hongos (sólido) Complejidad de preparación (micronutrientes).	Aplicación líquida Ácido p-cumárico

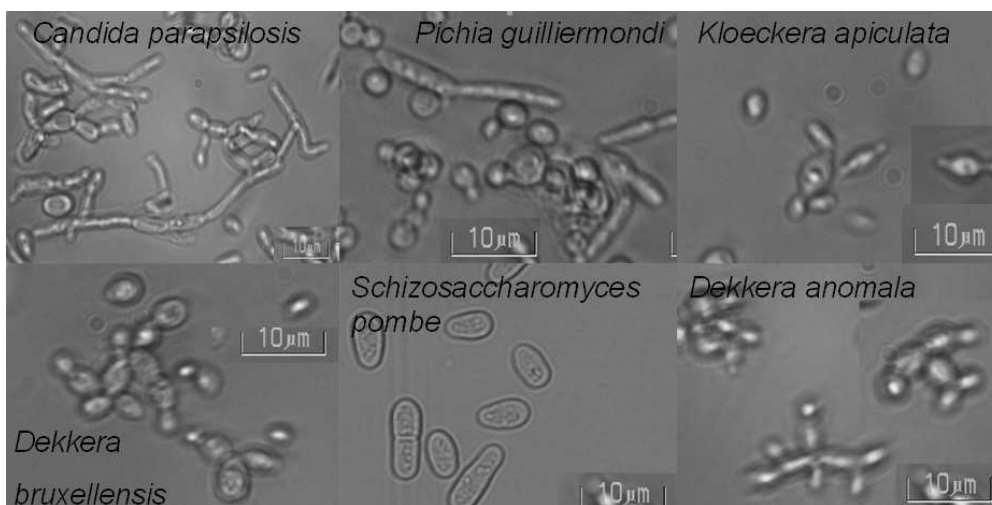


Fig. 1. Levaduras resistentes a Actidiona (10 y 100 mg/l).

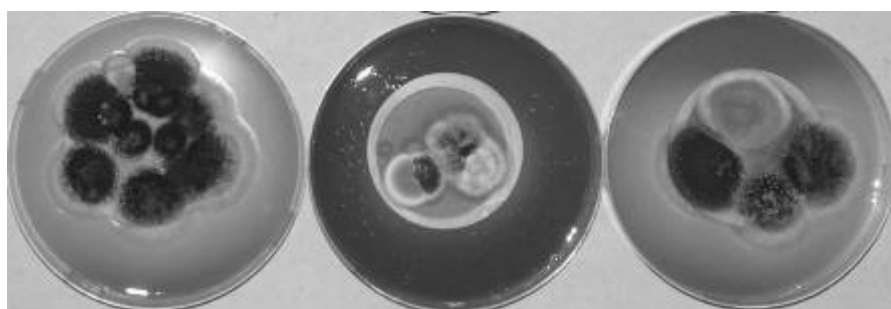


Fig. 2. Contaminaciones por hongos que dificultan o imposibilitan actividades de recuento y aislamiento.

Con objeto de paliar estos inconvenientes se emplean factores diferenciales como el ácido *p*-cumárico y el verde de bromocresol, que indican respectivamente la presencia de levaduras con actividad vinilfenolreductasa y la presencia de levaduras generadoras de ácido acético en concentraciones significativas.

## 2. Material y Métodos

Se han empleado medios modelo diferentes (Tabla 2) con varios microorganismos y vinos reales con contenidos anormales de etilfenoles. Se dosificaron a razón de 20 ml en placas Petri estériles para medios sólidos, ó 50 ml en matraces para medios líquidos. Previamente, se esterilizaron en autoclave durante 16 minutos a 121 °C. El ácido *p*-cumárico, verde de bromocresol y antibióticos fueron añadidos en solución etanólica tras ser filtrados con membrana de 0,45 µm. Los ensayos se realizaron por triplicado y fueron incubados a 25 °C. 125 ml de cada vino problema con contenidos elevados de 4 etilfenol se mezclaron con 125 ml de medio YEPDEAC líquido y otros 125 ml se filtraron con membranas de 0,45 µm, las cuales fueron depositadas en el mismo medio pero agarizado al 2 %. La generación de 4 etilfenol fue determinada por HPLC. Posteriormente 100 µl de cada medio líquido considerado positivo (Actividad vinilfenolreductasa positiva) y 1000 µl de cada medio líquido negativo fueron inoculados por inmersión en medio DBDM (Medio selectivo recomendado para el aislamiento de este género) sólido en placa de Petri. En la posterior clasificación taxonómica se emplearon las pruebas clásicas de asimilación y fermentación de azúcares. Además se han introducido dos pruebas adicionales, Resistencia a Actidiona y actividad enzimática vinilfenolreductasa determinada por HPLC en YEPD líquido con 100 mg/l de ácido *p*-cumárico, lo cual permite estimar el rendimiento de cada cepa.

Tabla 2. Medios selectivo-diferenciales para cultivo de *Brettanomyces/Dekkera*. EL: Extracto de levadura (g/l), Glc: Glucosa (g/l), Pept: Peptona (g/l), Et: etanol (%vol), Act: Actidiona (mg/l), pC: ácido *p*-cumárico (mg/l), BG: Verde de bromocresol (mg/l), Clor: cloramfenicol (mg/l), BN: base nitrogenada (g/l), AS: ácido sórbico (mg/l).

MEDIO	EL	Glc	Pept	Agar	ET	Act	pC	BG	Clor	BN	SB
YEPDEACBG	2	10	2	12	6	15	100	22	200		
DBDM				12	6					7	
YEPDE	2	10	2	12	8						
YEPDEL	2	10	2		8						
YEPDSB	2	10	2	12							250
YEPD	2	10	2	12							
YEPDA10	2	10	2	12		10					
YEPDA100	2	10	2	12		100					

## 3. Resultados

Todas las cepas estudiadas de las especies *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera anomala*, *Kloeckera apiculata*, *Hanseniospora uvarum*, *Pichia guilliermondi*, *Schizosaccharomyces pombe* y dos cepas de *Candida parapsilosis* (1336 y 1355) presentan resistencia a 10 y 100 mg/l de Actidiona. Sólo *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera anomala*, *Pichia guilliermondi* fueron capaces de asimilar etanol como única fuente de carbono. El etanol en medio líquido es microbicida para *Kloeckera apiculata*, *Hanseniospora uvarum* y *Candida parapsilosis* para 8% vol, pero sólo en medios líquidos, probablemente debido a la evaporación del etanol o condiciones de aerobiosis. El ácido sórbico resulto eficaz al inhibir levaduras resistentes a actidiona como *Kloeckera apiculata*, *Hanseniospora uvarum*, *Candida parapsilosis* y *Schizosaccharomyces pombe* para

dosis de 250 mg/l. *Pichia guilliermondi* resulta inhibida por 500 mg/l pero el retraso es de 96 horas. El recuento y detección de *Dekkera/Brettanomyces* en los vinos problema fue imposible de realizar en placas debido a contaminaciones por hongos [Figura 2]. En todos los vinos que presentaron actividad vinilfenol reductasa, fue aislada y clasificada *Dekkera bruxellensis* en medio DBDM y ocasionalmente *Pichia guilliermondi* aunque en población notablemente inferior.

### 3. Conclusiones

De los resultados obtenidos en este trabajo experimental de aplicación práctica se pueden deducir las siguientes conclusiones:

El factor selectivo actidiona ha demostrado ser bastante efectivo frente a la mayoría de las levaduras mayoritarias en vinificación. De las levaduras estudiadas sólo *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera anomala*, *Kloeckera apiculata*, *Hanseniospora uvarum*, *Pichia guilliermondi*, *Candida parapsilosis* y *Schizosaccharomyces pombe* son capaces de crecer en presencia de Actidiona (10 mg/l y 100 mg/l), pudiendo ocasionar falsos positivos en la mayoría de los medios comercializados. La utilización de ácido *p*-cumárico junto con levaduras de los géneros *Dekkera/Brettanomyces* provoca la aparición de descriptores olfativos atribuidos al 4-etilfenol, permitiendo detectar su presencia entre falsos positivos. La presencia de glucosa acelera el desarrollo de *Dekkera* respecto de los medios que no la emplean, aunque disminuye la selectividad de estos. Los cultivos realizados en medios líquidos solucionan las contaminaciones por hongos y permiten la cuantificación de etilfenoles por cromatografía. La especie dominante con actividad vinilfenol reductasa en los vinos contaminados estudiados ha sido *Dekkera bruxellensis* [1].

La utilidad de estos medios a nivel de industria enológica radica en sus ventajas respecto de otras técnicas empleadas (biología molecular) ya que su realización es sencilla, su coste es reducido, los tiempos de obtención de resultados son aceptables y permite la detección de microorganismos viables antes de la generación de defectos con la consiguiente posibilidad de aplicar medidas preventivas y/o terapéuticas que eviten la formación de etilfenoles.

### 4. Bibliografía

1. Van Der Walt, J.P.; Van Kerken, A.E. 1960. **The wine yeasts of the Cape. Part IV. Ascospore formation in the genus *Brettanomyces*.** *Antonie van Leeuwenhoek*, 26, 291-296.
2. Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, J.N.; Pons, M. 1992. **The origin of ethylphenols in wines.** *J. Sci. Food Agric*, 60, 165-178.
3. Alguacil, M.; Fidalgo, M.; Jiménez, J.; Lozano, J.I.; Neva, M.A.; Perdignes, F. 1998. **Detección de *Brettanomyces/Dekkera* en instalaciones de vendimia mediante PCR.** *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 10, 81-85.
4. Mittrakul, C.; Henick-Kling, T.; Egli, C.. 1999. **Discrimination of *Brettanomyces/Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprinting methods.** *Food Microbiol.* 16, 3-14.
5. Rodrigues, N.; Gonçalves, G.; Pereira-da-Silva, S.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. 2001. **Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*.** *Journal of Applied Microbiology*. 90, 588-599.
6. Couto, J.A.; Barbosa, A.; Hogg, T. 2005. **A simple method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines.** *Letters in Applied Microbiology*. 41, 505-510.
7. [www.millipore.com/techservice](http://www.millipore.com/techservice). *Brettanomyces* Selective Medium.