

**DETECTION AND QUANTIFICATION OF
Brettanomyces/Dekkera IN WINE BY REAL TIME PCR.
COMPARISON WITH THE MICROBIOLOGICAL METHOD.**

**DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *Brettanomyces/Dekkera*
EN VINO TINTO POR PCR EN TIEMPO REAL. COMPARACIÓN
CON EL MÉTODO MICROBIOLÓGICO.**

Cauré Portugal, Vanesa Calvo, Myriam Zarazaga, Carmen Torres, Fernanda Ruiz-Larrea¹

***Universidad de La Rioja, Depto. de Agricultura y Alimentación
Av. Madre de Dios, 51. 26006 Logroño***

¹fernanda.ruiz@unirioja.es

Área temática: Enología

Resumen

La nueva tecnología de PCR en tiempo real (PCRtr) permite la cuantificación precisa de la cantidad de DNA contenida en una muestra y por ende, del número de células presentes en la misma. El objetivo de este trabajo ha sido aplicar la técnica de PCRtr a la detección y cuantificación de la levadura contaminante *Brettanomyces/Dekkera* en vinos tintos, determinar los límites superior e inferior de validez de este método y compararlo con el método clásico de recuentos en medio de cultivo selectivo.

Los resultados muestran que el método de PCRtr es rápido, altamente específico y de gran sensibilidad, llegando a detectar y cuantificar hasta 4 células/mL, tardándose en el análisis unas 7 horas. El cultivo en el medio específico YPD-bromocresol permite una cuantificación de hasta alrededor de 2 células/mL y el análisis consume varios días (12-14 días). Los resultados también muestran que la presencia de vino influye negativamente en el análisis por PCRtr, y desplaza el intervalo de validez para la cuantificación por este método hacia valores más elevados (límite inferior: 40 células/mL de vino). Sin embargo, este factor no influye en el método de cultivo en el medio selectivo.

Abstract

The new methodology of real time PCR (PCRtr) allows precise quantification of DNA in a sample, and thus, the number of cells in that sample. The aims of this study were: applying the technique of PCRtr to detect and quantify the spoilage *Brettanomyces/Dekkera* yeast in red wine, establishing the upper and lower thresholds of the method, and comparing with the classical method of growth and colony counting in a selective culture medium.

Results show that the quick method of PCRtr is highly specific and sensitive, allows detection and quantification of down to 4 cells/mL and analysis requires

around 7 hours. Culture in the selective YPD-bromocresol medium allows detecting and quantifying around 2 cells/mL and analysis is time-consuming (12-14 days). Results show as well that the presence of wine negatively affects PCRtr analysis, and modifies the interval for correct quantification towards higher concentrations (minimal threshold: 40 cells/mL of wine). Nevertheless, this factor has no effect on the method of culture in the selective medium.

Palabras-clave

Brettanomyces, PCR en tiempo real, vino.

Key words

Brettanomyces, real-time PCR, wine.

1. INTRODUCCIÓN

La levadura *Brettanomyces*, también denominada *Dekkera* cuando está en su forma esporulada, es una levadura alterante de los vinos y causante de pérdidas millonarias en la industria enológica. Es la responsable de la síntesis, entre otros compuestos, de etil fenoles y tetrahidropiridinas que dan lugar a los aromas alterantes de los vinos denominados "olor a caballo o a establo". Su hábitat más frecuente es el vino tinto envejecido en barricas de madera, y uno de los problemas más difíciles de resolver es su aislamiento y correcta identificación, sobre todo en un ambiente constituido por una población mixta de levaduras, la mayoría de ellas beneficiosas y del género *Saccharomyces*.

En la actualidad se puede elegir entre una amplia gama métodos microbiológicos que permiten el cultivo y la identificación específica de *Brettanomyces/Dekkera*, así como métodos y técnicas de la biología molecular que permiten una más rápida y precisa identificación de células de esta levadura contaminante (Suarez *et al.*, 2007). El método rápido de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se ha aplicado con éxito a la detección de esta levadura alterante. Así el método de Ibeas y colaboradores (1996), basado en la amplificación selectiva en dos etapas (PCR anidada) del DNA de *Brettanomyces/Dekkera*, es capaz de detectar hasta 10 células de la levadura contaminante en una muestra de vino y el análisis se puede llevar a cabo en unas pocas horas sin necesidad de realizar cultivos de la muestra, los cuales requieren varios días para el crecimiento de la levadura. Sin embargo, éste no es un método adecuado para el análisis cuantitativo puesto que únicamente detecta la presencia de las células contaminantes.

Por otro lado, la nueva metodología de PCR en tiempo real (PCRtr) permite la cuantificación precisa de la cantidad de DNA contenida en una muestra, y consecuentemente del número de células presentes en la misma (Wilhelm and Pingoud, 2004). Este método rápido de la biología molecular empleado para el análisis de muestras de mosto o vino, permitiría la adopción de medidas de profilaxis rápidas y en el momento preciso. En ese contexto, Phister y Mills (2003) desarrollaron un método de PCR cuantitativa específica para *Brettanomyces/Dekkera* en vinos utilizando cebadores con la secuencia del gen codificante del RNAr 26S (una de las pocas secuencias disponibles para dicho género) y según los autores se logra detectar hasta aproximadamente 1 ufc/mL

de muestra de vino. Delaherche y colaboradores (2004) también desarrollaron un método de PCRtr para la detección de *Brettanomyces/Dekkera* utilizando para ello cebadores distintos, y con su método lograron detectar hasta 10^4 ufc/mL de vino.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo ha sido aplicar la técnica de PCRtr, utilizando el método descrito por Phister y Mills (2003), a la detección y cuantificación de la levadura contaminante *Brettanomyces/Dekkera* en vinos tintos, determinar los límites superior e inferior de validez de este método y compararlo con el método clásico de recuentos en medio de cultivo selectivo.

3. MATERIALES Y MÉTODO

3.1. Cepas de levaduras empleadas

Se utilizó la cepa de colección de origen enológico *Brettanomyces/Dekkera* BY-24 y como control negativo la cepa de colección *S. cerevisiae* LV-5. Todas las cepas de levaduras se crecieron en medio sólido YPD-agar.

3.2. Extracción y aislamiento del DNA

Se realizaron extracciones del DNA de células de la cepa *Brettanomyces/Dekkera* BY-24 en las siguientes condiciones:

a) Células de *Brettanomyces/Dekkera* en solución salina (NaCl 0,9%) estéril con un total de $4 \cdot 10^7$ células/mL. Después de la extracción del DNA siguiendo los pasos indicados abajo, se realizaron diluciones seriadas decimales hasta $6 \cdot 10^{-6}$ ng/ μ L de DNA.

b) Células de *Brettanomyces/Dekkera* BY-24 en solución salina estéril con diluciones seriadas decimales de $4 \cdot 10^7$ células/ml hasta 4 células/ml y mantenidas durante 24 horas a 4° C.

c) células de *Brettanomyces/Dekkera* BY-24 en vino tinto filtrado (0,20 μ m, CORNING®) con diluciones seriadas decimales de $4 \cdot 10^7$ células/ml hasta 4 células/ml y mantenidas durante 24 horas a 4° C.

La extracción del DNA se realizó siguiendo el método de lisis celular consistente en la resuspensión de las células en buffer de lisis (Tris/HCl pH 8 50mM y β -mercaptoetanol 10mM) e incubación a 37°C con líticasa (3mg/mL, Sigma) durante 50 minutos. La muestra posteriormente se sometió a un tratamiento en baño de agua a 100°C durante 15 minutos. Después de una congelación (-80°C) y descongelación de la muestra y agitación vigorosa de la misma con vortex, se filtró la muestra por una columna (Ultracel YM-100, MICROCON®, Millipore) para purificación y concentración final del DNA, de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

3.3. Análisis por PCRtr

Se realizó utilizando las condiciones y los *primers* específicos Dbrux-F y Dbrux-R del rRNA que producen un amplicón de 79pb (Phister y Mills, 2003), y mediante la detección en tiempo real de la fluorescencia emitida por el fluoróforo SYBR Green I (“*iQ SYBR Green Supermix*”, *RioRad*) con el equipo *i-Cycler*[®] (*BioRad*).

Todos los análisis se realizaron por triplicado, y en todos ellos se incluyeron muestras del DNA extraído de la cepa *S. cerevisiae* LV-5 como control negativo.

4. RESULTADOS

Figura 1. Medio de cultivo específico YPD-bromocresol con viraje debido al crecimiento de células de *Brettanomyces/Dekkera*.



El medio YPD-bromocresol es un medio específico que, como puede verse en la figura 1, permite la identificación y recuento de colonias (UFC/ml) de *Brettanomyces/Dekkera*, que se identifican fácilmente por el viraje del color del medio a amarillo y el olor característico que se genera al crecer esta levadura en el medio (Rojo-Bezares *et al.*, 2003).

Tabla 1: Recuento de levaduras totales y de *Brettanomyces/Dekkera* en muestras de vinos tintos.

Vino	Levaduras Totales ufc/mL	<i>Brettanomyces/Dekkera</i> ufc/mL
1	1090	2
2	1500	3
3	75	41
4	65	38
5	1200	6
6	1600	2

Este método permite la cuantificación de células viables de *Brettanomyces/Dekkera* en vinos en presencia de células de otras levaduras en concentraciones muy superiores a las de *Brettanomyces/Dekkera*. En nuestros análisis logramos detectar *Brettanomyces/Dekkera* presente en el vino en concentraciones hasta 500 veces por debajo de las de otras levaduras también presentes, y conseguimos recuentos de hasta 2 ufc/mL, como se puede observar en la Tabla 1. Los resultados en este tipo de análisis microbiológico requieren un periodo de incubación de 12 a 14 días, sin embargo, tiene la ventaja de que permite el recuento de células viables.

Figura 2. Curvas de amplificación de PCRtr obtenidas con diluciones seriadas de DNA (de 6 ng/μL a 6.10⁻⁵ ng/μL).

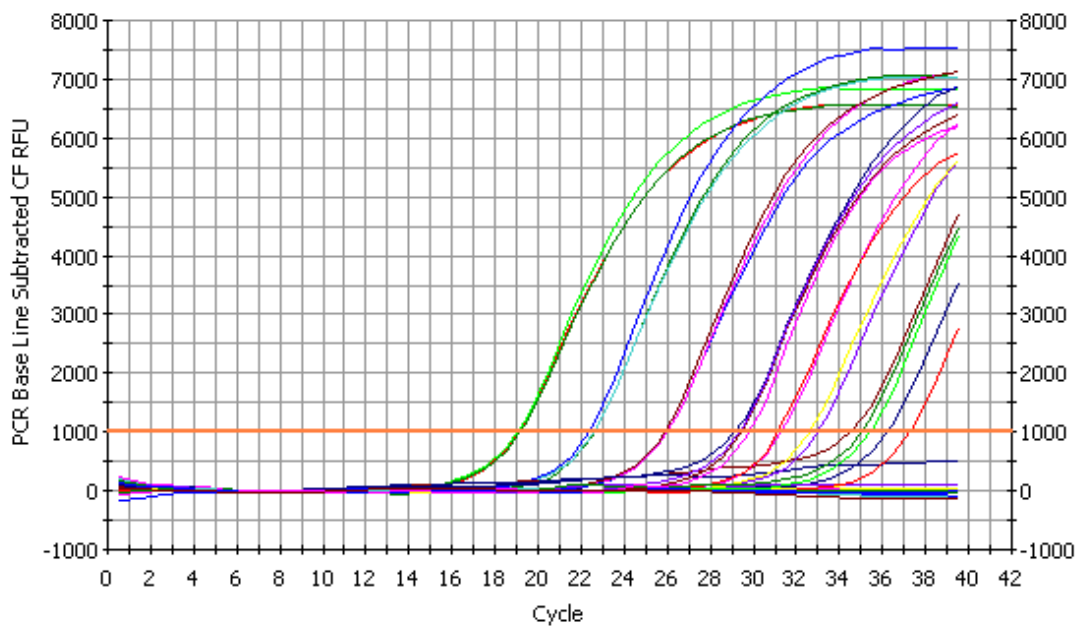
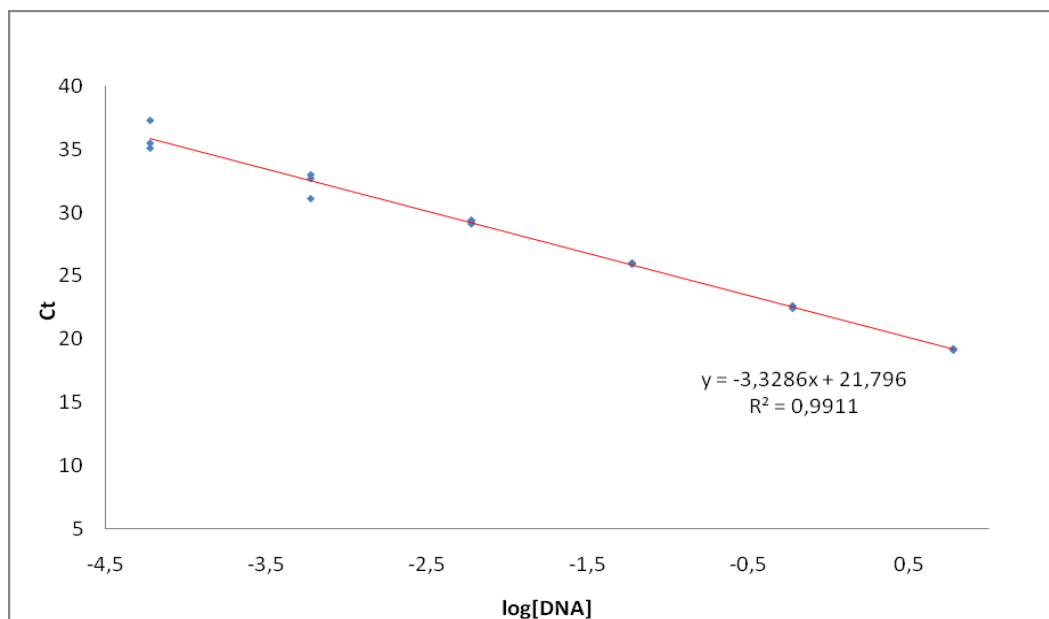


Figura 3. Recta obtenida representando los valores de Ct (threshold cycle) frente al logaritmo decimal de la cantidad de DNA por tubo (de 6 ng/μL a 6.10⁻⁵ ng/μL).



Los resultados según el método “a” de extracción y dilución seriada del DNA con el posterior análisis de PCRtr (figura 2) no dio señal para la máxima dilución ($6 \cdot 10^{-6}$ ng de DNA/ μ L). Los resultados obtenidos indicaron que el límite de detección de este método es de $6 \cdot 10^{-5}$ ng de DNA/ μ L.

Figura 4. Curvas de amplificación de PCRtr obtenidas con el DNA extraído de diluciones seriadas de células en solución salina (de $4 \cdot 10^7$ a 4 células/mL).

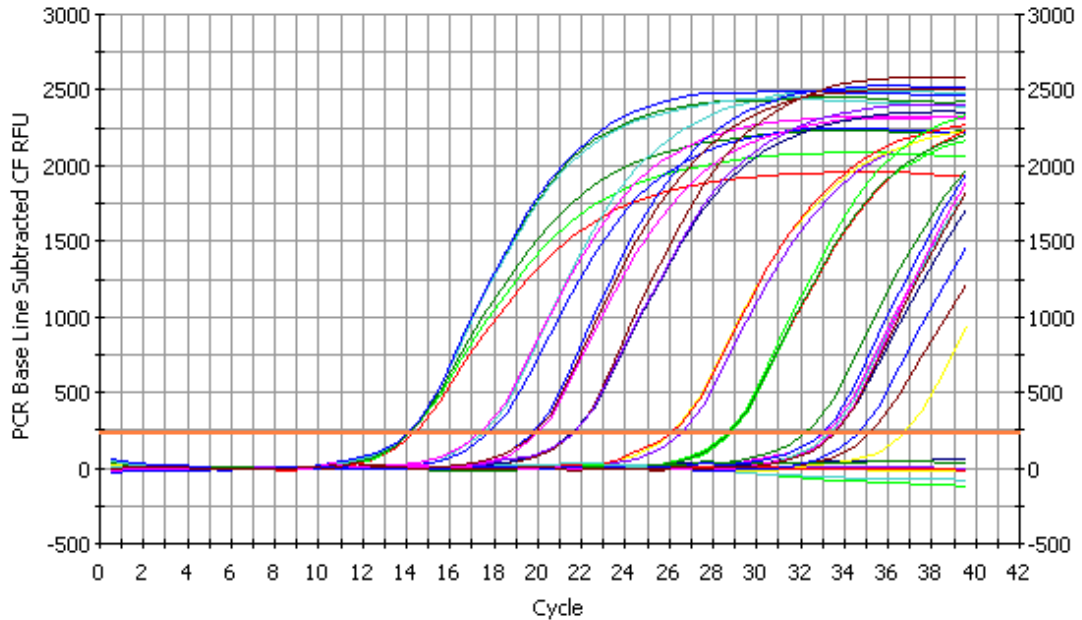
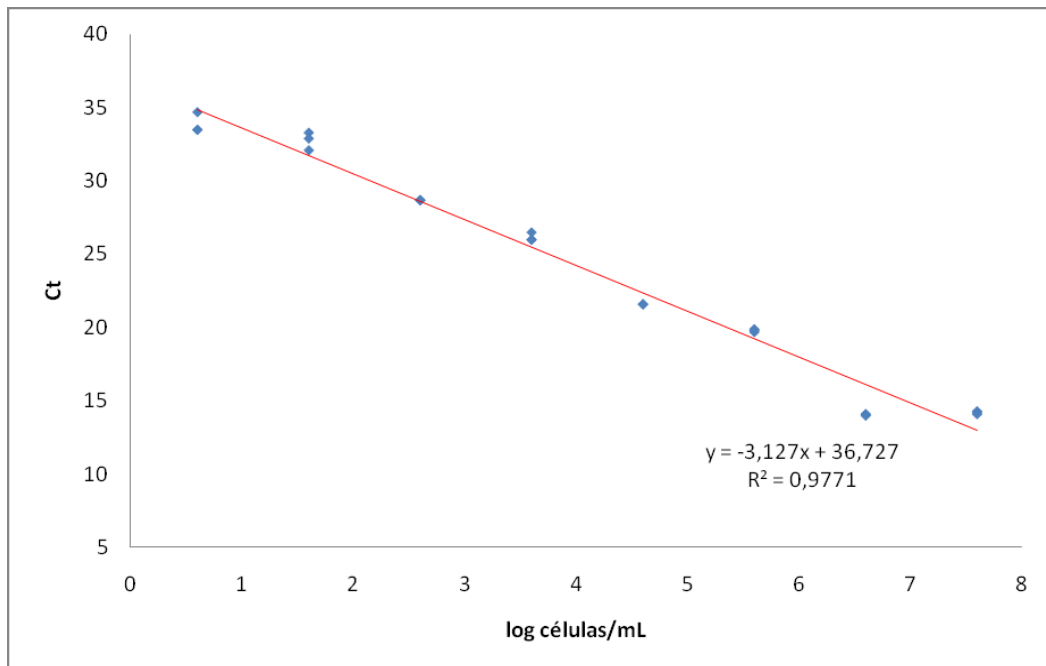


Figura 5. Recta obtenida representando los valores de Ct (threshold cycle) frente al logaritmo decimal del número de células/mL (solución salina).



Los resultados obtenidos de acuerdo con el método “b”, de extracción a partir de diluciones seriadas de células mantenidas en solución salina y posterior análisis por PCRtr, se muestran en las figuras 4 y 5. En este caso el límite

inferior de detección de la técnica fue de 4 células/mL y el límite superior de detección fue de $4 \cdot 10^6$ células/mL.

Figura 6. Curvas de amplificación de PCRtr obtenidas con el DNA extraído de diluciones seriadas de células en vino tinto (de $4 \cdot 10^7$ a 4 células/mL).

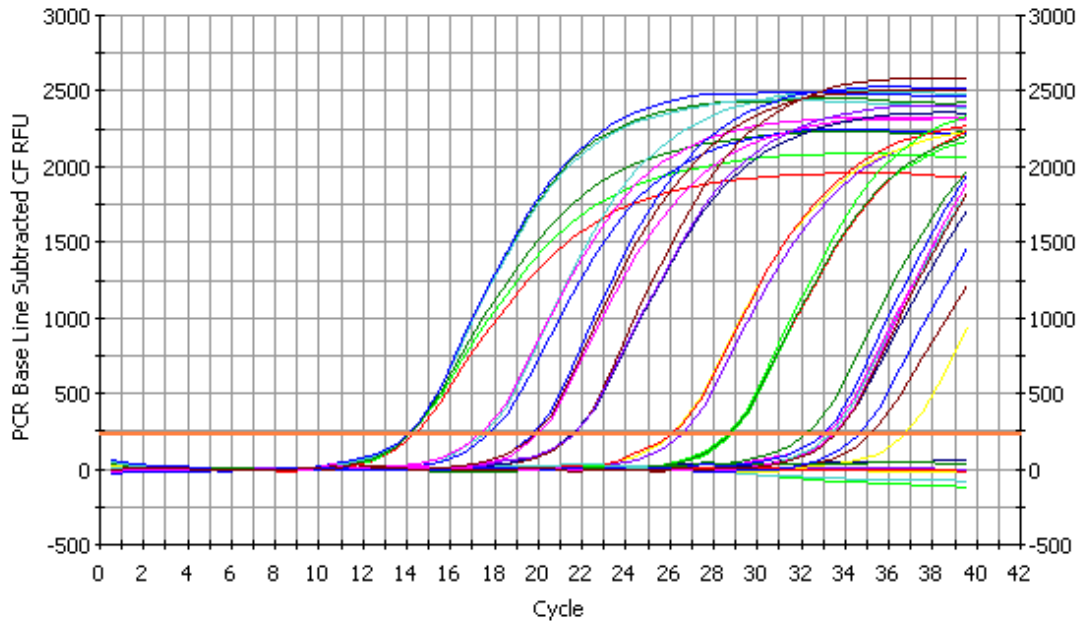
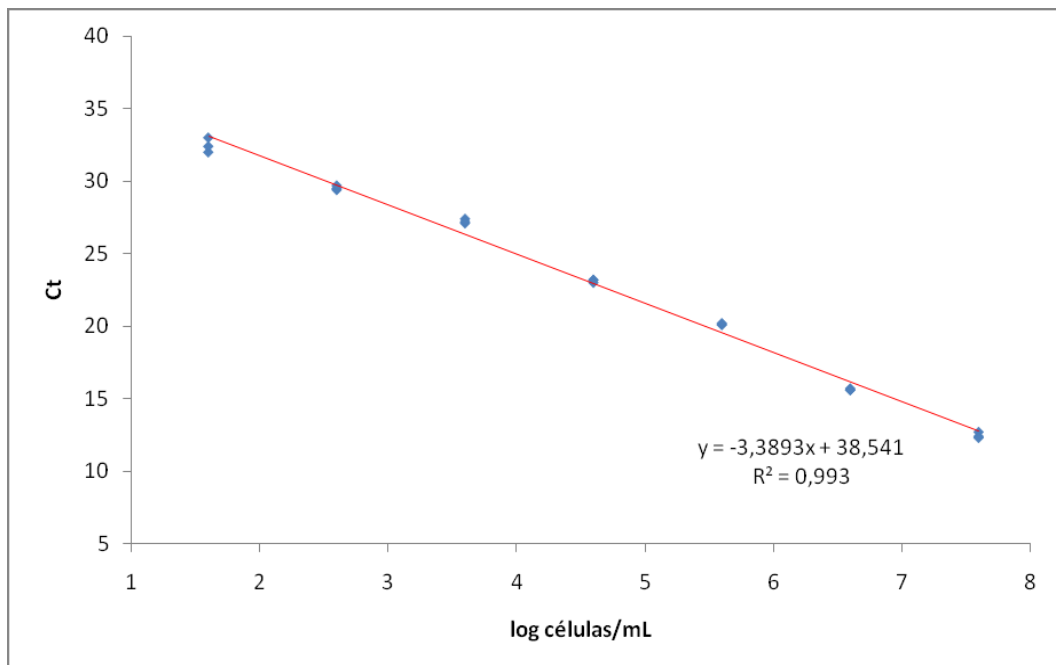


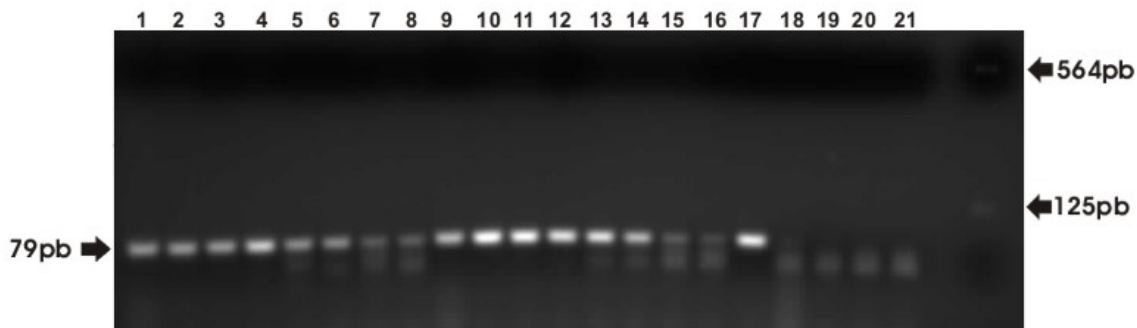
Figura 7. Recta obtenida representando los valores de Ct (threshold cycle) frente al logaritmo decimal del número de células/mL (vino tinto).



Los resultados según el método “c” de dilución seriada de células mantenidas en vino y posterior extracción y análisis del DNA (figura 6) no dio señal para la máxima dilución (4 células/mL). Los resultados obtenidos indicaron que el límite de detección de este método es de 40 células/mL y el límite superior se

encontraría por encima de $4 \cdot 10^7$ células/mL, el cual incluye tanto células viables como no viables.

Figura 8. Imagen del gel de electroforesis (2%) de los amplicones obtenidos en las reacciones de PCRtr.



Amplicones obtenidos en las reacciones de PCRtr a partir de: 1-8 (células en vino en las concentraciones de $4 \cdot 10^7$ a 4 células/mL); 9-16 (células en solución salina en las concentraciones de $4 \cdot 10^7$ a 4 células/mL); 17 (control positivo); 8-21 (controles negativos).

Como se puede observar en la figura 8, no hay correlación directa entre la cantidad de células en una muestra y la señal observada en el gel de electroforesis.

5. CONCLUSIONES

1. El método de PCRtr es adecuado para la detección específica e identificación de la levadura *Bretanomyces/Dekkera* y reduce el tiempo de análisis de más de una semana a unas 7 horas, cuando se compara con el método clásico de cultivo en un medio específico.
2. El método de PCRtr tiene un límite inferior de detección de $6 \cdot 10^{-5}$ ng de DNA/ μ L.
3. El método de PCRtr presenta un límite inferior de detección de 4 células/mL resuspendidas en solución salina, y presenta un límite inferior para la correcta cuantificación de *Bretanomyces/Dekkera* de: 40 células/mL cuando las células han estado en vino.
4. El rango de linealidad del método de PCRtr tiene un límite superior por encima de $4 \cdot 10^7$ células/mL de vino, y de $4 \cdot 10^6$ células/mL cuando las células están en solución salina.
5. En el intervalo comprendido entre el límite superior e inferior, tanto en vino como en solución salina, la linealidad obtenida con este método de detección y cuantificación es óptima.

Referencias

DELAHERCHE, A.; CLAISSE, O. Y LONVAUD-FUNEL, A. (2004). "Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time chain reaction". *J. Appl. Microbiol.*, Vol. 97, pgs. 910-915.

IBEAS, J.I.; LOZANO, I.; PERDIGONES, F. Y JIMENEZ, J. (1996). "Detection of *Dekkera/Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method". *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 62, nº 3, pgs. 998-1003.

PHISTER, T.G. Y MILLS, D.A. (2003). "Real-time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine". *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 69, nº 12, pgs. 7430-7434.

ROJO-BEZARES, B.; CALVO DE LA BANDA, M. T.; TORRES, C. Y RUIZ-LARREA, F (2003). "Detección de *Brettanomyces/Dekkera* en vinos y material de bodega". Libro de actas del VI Congreso Nacional de Gienol (Logroño).

SUÁREZ, R.; SUÁREZ-LEPE, J.A.; MORATA, A. Y CALDERÓN, F. (2007). "The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*. A review". *Food Chem.*, Vol. 102, nº 1, pgs. 10-21.

WILHELM, J. Y PINGOUD, A. (2004). "Quantitative analysis of nucleic acids: the last few years of progress (Rev)". *J. Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 37, nº 1, pgs. 1-10.