

PRESENCIA DE LA LEVADURA *BRETTANOMYCES* EN LAS BAYAS DE UVA: INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE LA VIÑA

GILIS J.-F. ¹, BARBIN P. ², STREHAIANO P. ², TAILLANDIER P. ²

¹ SARL OENODEV,

² LGC de Toulouse (Francia), CNRS UMR 5503

RESUMEN

Las levaduras del género *Dekkera/Brettanomyces* son reconocidas como contaminantes, responsables de los defectos fenólicos y animales en vinos tintos. Gran cantidad de hipótesis, a veces contradictorias, han sido emitidas en cuanto al origen y nicho ecológico, pero ninguna ha permitido precisarlo. Es por eso que emprendimos un programa de investigación para verificar la presencia de *Brettanomyces* en el viñedo y precisar los factores favorables. Los primeros estudios realizados en Sudamérica a partir de 2001 permitieron situar las bases de una tesis doctoral iniciada en 2004. Nuestro estudio confirma, por la primera vez, la presencia de *Brettanomyces* sobre las bayas. La utilización de hileras experimentales y de una parcela piloto, permitieron estudiar diferentes factores de la viña. Así ponemos en evidencia una repartición heterogénea en el seno de una parcela, en relación directa con los factores ambientales. De forma general, mostramos que los factores susceptibles de modificar la integridad de la baya, tienen una influencia sobre la presencia de *Brettanomyces* en el viñedo.

Palabras clave: *Brettanomyces*, Uva, Viñedo, Contaminación, Defectos

INTRODUCCION

Las levaduras del género *Dekkera/Brettanomyces* están reconocidas como serios agentes de contaminación de vinos tintos, responsables de defectos fenólicos y animales cuando se desarrollan en cubas, barricas o botellas. Numerosas hipótesis, a veces contradictorias han sido emitidas en cuanto al origen de estos contaminantes y a su nicho ecológico, pero ninguna ha permitido precisarlos realmente. La idea misma de que estas levaduras puedan ser parte de la flora natural de la uva está aun hoy en día muy discutida (Larue et al. (1991); Wright et Parle (1973); Peynaud et Domercq (1956); Roset (1970); Ganga et Martinez (2003)). En este contexto, CEnodev ha organizado vastas campañas mundiales de investigación, aliando las investigaciones de laboratorio y las observaciones sobre el terreno para verificar la presencia de *Brettanomyces* en el viñedo y precisar los factores favorables. Los primeros estudios realizados en Sudamérica desde 2001 han permitido fijar las bases de una tesis doctoral iniciada en 2004 en el "Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse" del profesor Strehaiano. Gracias al estudio de una parcela piloto de la variedad Merlot, hemos podido verificar el impacto de diferentes factores sobre la presencia del contaminante y su distribución en el seno de un viñedo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de uva son tomadas la víspera de la vendimia de forma aséptica en bolsas estériles. Las tijeras que se usan para cortar los racimos se limpian con alcohol y se flamean entre cada muestra. La uva es aplastada en la misma bolsa y luego se agrega un medio líquido de enriquecimiento (Gilis, 1999). Se llevan a



incubación a temperatura ambiente durante 60 días. Una observación al microscopio permite poner en evidencia un crecimiento celular. Luego se verifica la presencia de *Brettanomyces* por cultura en medios selectivos y/o por PCR (Fig. 1). Paralelamente (parcela "La Violette" únicamente), se muestrean 200 bayas de cada zona para evaluar el estado fisiológico de la uva y el progreso de la maduración (Fig. 2) gracias a análisis en infrarrojo (Multispec, Microdom-Cetim) y Dyostem (Sféris).

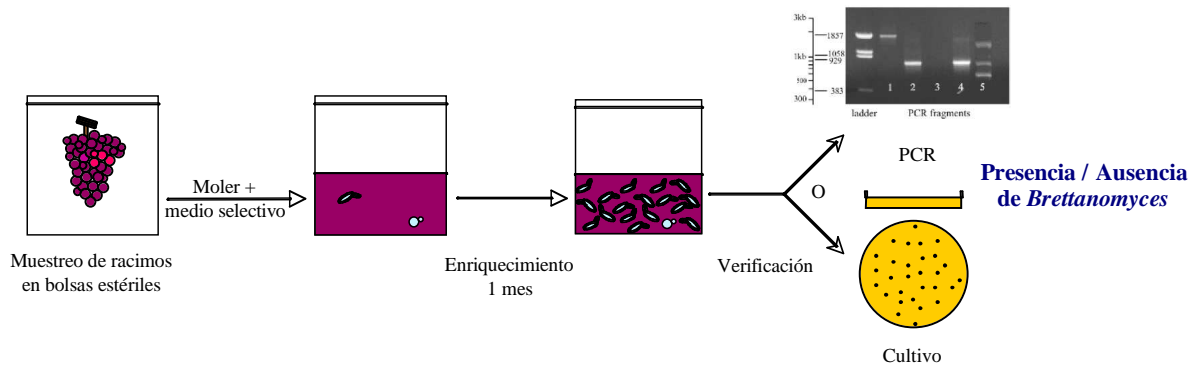


Figura 1: protocolo de análisis de la presencia de *Brettanomyces* en el viñedo.

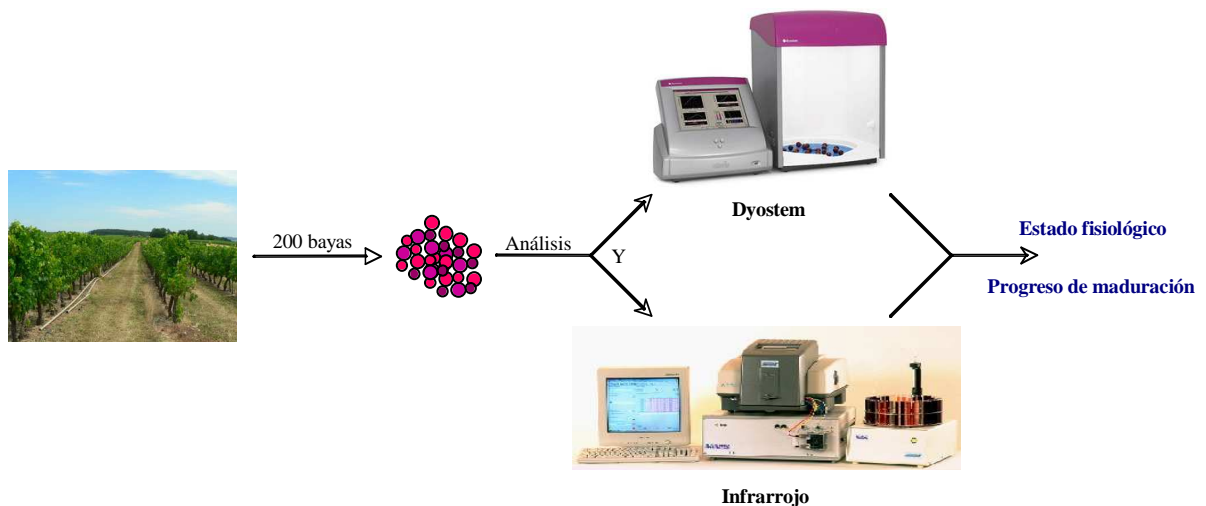


Figura 2: protocolo de análisis del estado fisiológico y del nivel de madurez de las bayas de la parcela "La Violette".

RESULTADOS

Estudios preliminares en Francia y en Sudamérica

Entre 2001 y 2003, una primera campaña de investigación sobre el tema ha permitido poner en evidencia la presencia de *Brettanomyces* en la uva de viñedos muy diferentes. Se han realizado muestreos en un viñedo de la región de Canelones, Uruguay; en diferentes viñedos de la provincia de Mendoza, Argentina y en Francia en viñedos de las apelaciones Bordeaux, Madiran y Buzet. Estos muestreos se realizaron sobre racimos que presentaban bayas dañadas. Este estudio muestra que *Brettanomyces* está presente en la uva con una frecuencia y concentraciones diferentes según las regiones geográficas. En promedio, estas levaduras son detectables en el 12,5% de las muestras de racimos dañados. Las variedades implicadas son Merlot, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Tannat, Fer Servadour, Ancelota, Zynfandel y Malbec. Ninguna otra variedad ha sido objeto del muestreo. Se puede pensar que todas estas variedades están



concernidas y que no existe especificidad con el cepage. Desde un punto de vista geográfico, parece que *Brettanomyces* es más frecuente en Argentina que en Uruguay, pero en concentración menos elevada en los racimos contaminados (búsqueda con medio enriquecido). Los muestreos realizados en Francia parecen los más afectados y *Brettanomyces* aparece con una frecuencia 2 veces más alta que en Sudamérica, pero también como en Argentina, en baja concentración (tabla 1).

Lugar	Cantidad de muestreos	Resultados positivos (%)	Búsqueda directa
Argentina	27	11	No
Uruguay	44	7	Si
Francia	49	18	No

Tabla 1: Resultado de la búsqueda de la levadura *Brettanomyces* en diferentes viñedos de Francia, Argentina y Uruguay.

Distribución de los contaminantes en el seno de una parcela testigo

A partir de estos resultados importantes y gracias al trabajo de tesis doctoral de Pascal Barbin (2006), hemos querido verificar cuales son los factores ambientales susceptibles de influir en la presencia y distribución del contaminante en el seno de una misma parcela ("La Violette", Fig. 3) en dos campañas consecutivas. La parcela fue dividida en cinco sub-parcelas para analizar zonas diferentes marcadas de 1 a 5. Existe un bosque que genera partes sombreadas en las zonas 1 y 5. Estas zonas se caracterizan por una humedad matinal que puede persistir hasta el medio día en la zona 1, contrariamente al resto de la parcela, que se seca rápidamente por el sol. Se nota igualmente una diferencia de temperatura que puede ser de hasta 8°C durante la mañana entre las zonas sombreadas y las zonas soleadas. Estas zonas 1 y 5 tienen un comportamiento fisiológico muy diferente de otras zonas, como lo muestran los resultados de los análisis Dyostem e infrarrojos (Fig. 4 y 5). El volumen promedio de las bayas y las cargas en azúcar y potasio son sistemáticamente más elevados en las uvas de las zonas 1 y 5, mostrando una diferencia de madurez importante respecto a otras zonas. Los resultados de la búsqueda de 2 años consecutivos muestra la presencia sistemática del contaminante en las zonas húmedas 1 y 5, situadas a la sombra del bosque (Fig. 6). Sin embargo, los dos años fueron distintos, 2004 lluvioso y 2005 muy seco. Los racimos implicados son sistemáticamente dañados por los pájaros y atacados por *Botrytis*. Este tipo de racimos no se encuentran en las otras zonas soleadas (Fig. 7). Una serie de muestras han sido tomadas para comparar en el mismo pie de viña los racimos sanos y los racimos dañados (2 x 10 racimos) de la zona 1. Los resultados presentados en la tabla 2 muestran una presencia de *Brettanomyces* en la totalidad de los racimos dañados y una presencia menor en los racimos sanos. Por otra parte, el estudio de otra parcela (protocolo Fig. 8) ha mostrado un neto aumento de la presencia de *Brettanomyces* cuando las condiciones lluviosas son provocadas artificialmente (75 mm durante 3 semanas) o que los racimos son voluntariamente dañados. Inversamente, cuando las viñas son protegidas de la humedad por una lona, la presencia de *Brettanomyces* se encuentra fuertemente disminuida. Por ultimo, el empleo del producto anti-*Botrytis* limita sensiblemente la presencia del contaminante impidiendo la degradación de las bayas causada por el hongo (Tabla 3).

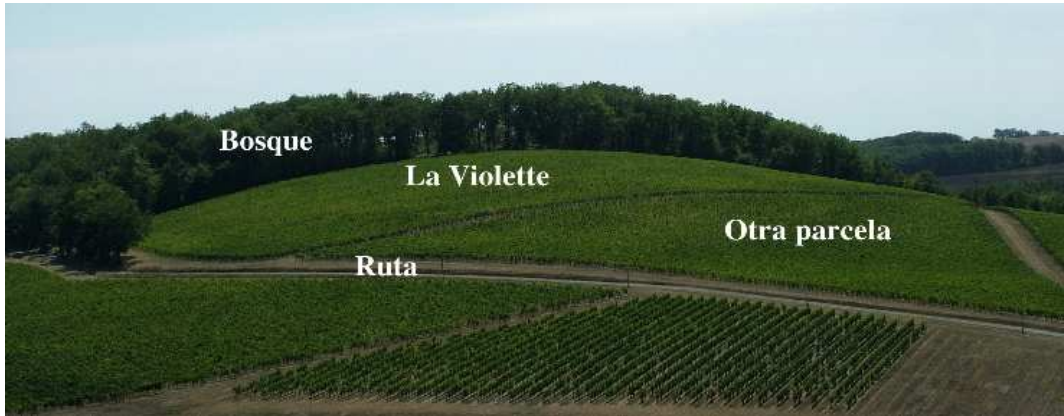


Figura 3: entorno geográfico de la parcela "La Violette"

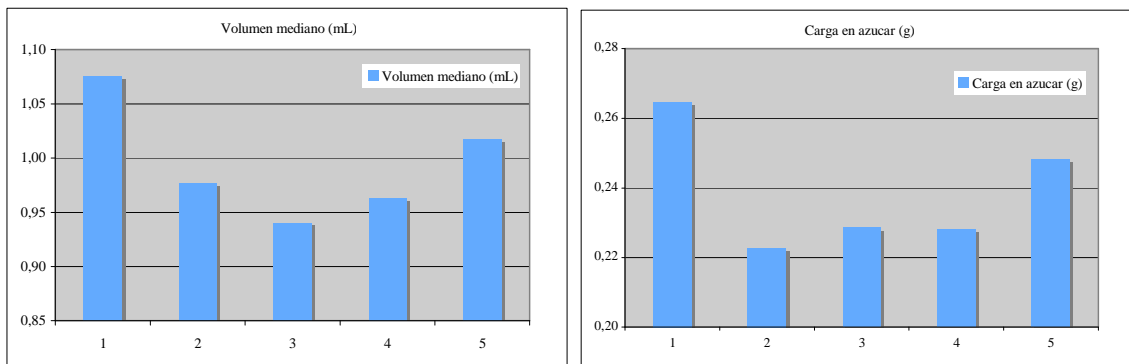


Figura 4: Resultados del análisis fisiológico (volumen de baya mediano y carga en azucar) al momento de la cosecha de las 5 zonas de la parcela "La Violette".

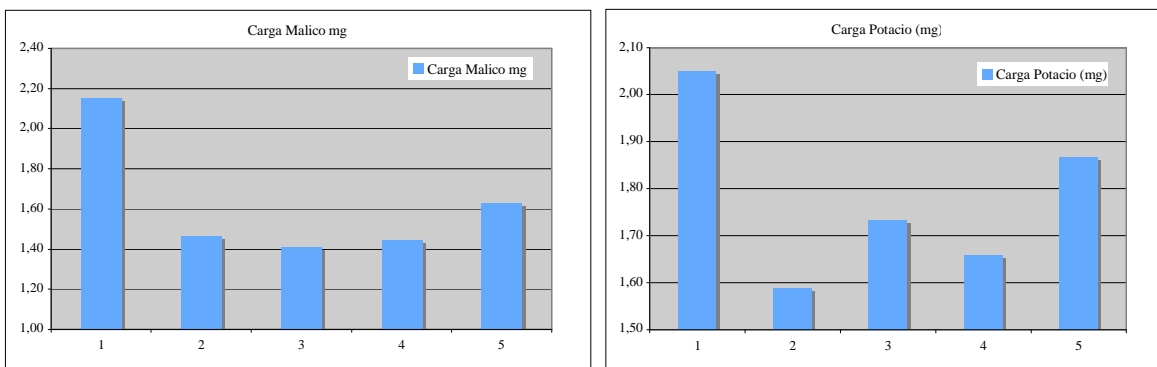


Figura 5: Resultados del análisis fisiológico (carga en malico y potasio) al momento de la cosecha de las 5 zonas de la parcela "La Violette".

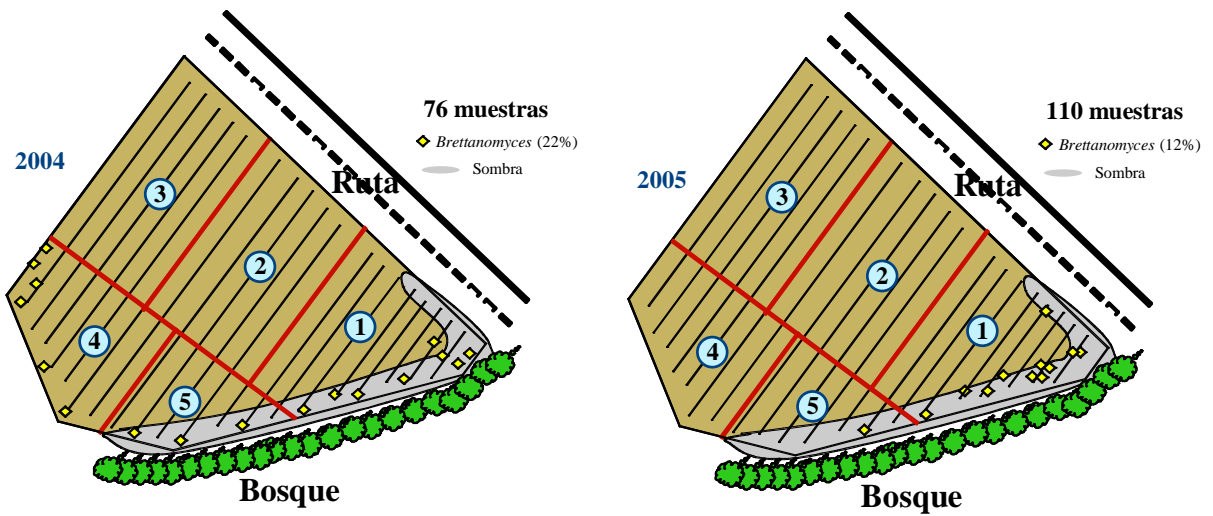


Figura 6: Influencia de los factores ambientales en la distribución de *Brettanomyces* en el seno de la parcela piloto "La Violette" en dos campañas consecutivas (2004 húmedo y 2005 seco).

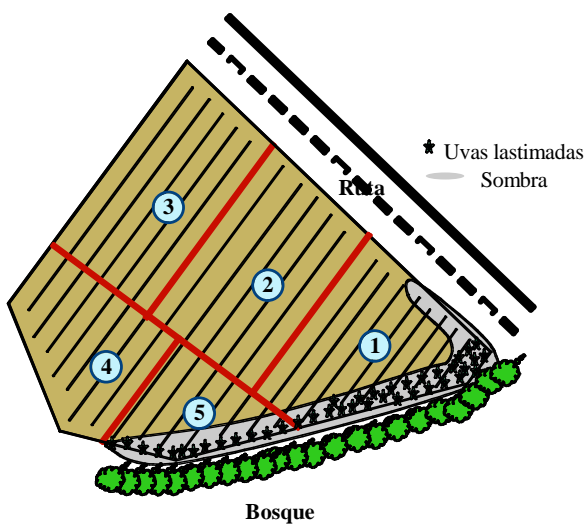


Figura 7: distribución de la uva dañada en función de la iluminación.

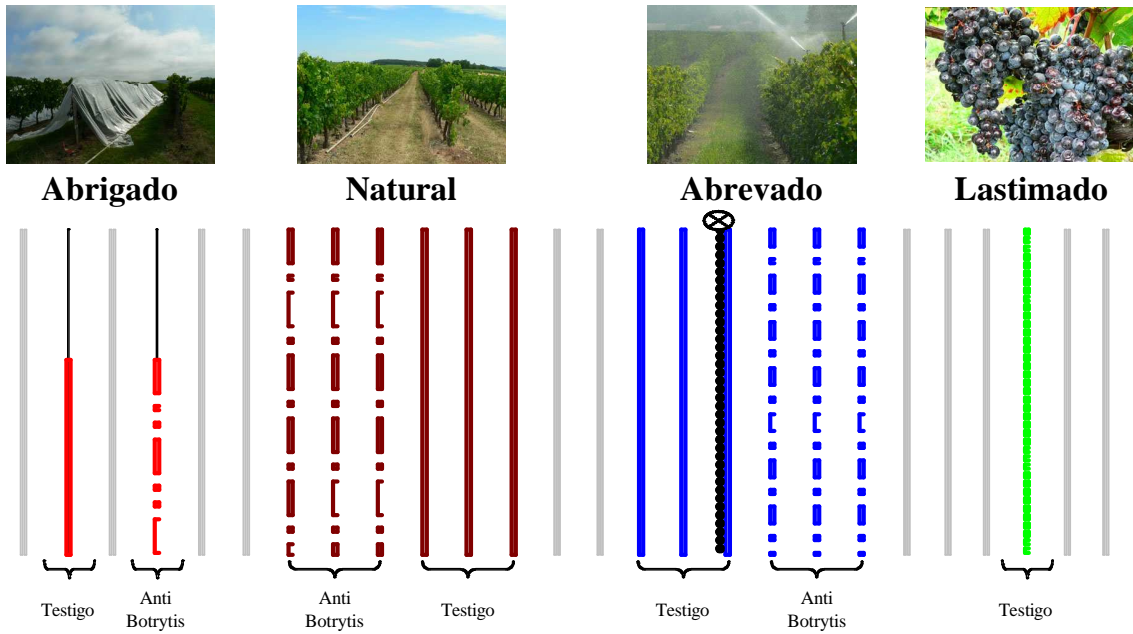


Figura 8: protocolo de estudio de las diferencias modalidades que influyen sobre la presencia de *Brettanomyces* en el viñedo.

Muestra	Racimo		Fila
	Sano	Lastimado	
1	-	+	3
2	-	+	4
3	+	+	8
4	-	+	9
5	+	+	10
6	-	+	12
7	+	+	13
8	+	+	16
9	-	+	18
10	-	+	20
Total	40%	100%	

Tabla 2: influencia de la integridad de las uvas sobre la presencia de *Brettanomyces* en el viñedo (+ = presencia).



Modalidad	Muestra con <i>Brettanomyces</i> (%)	
	Sin tratamiento	Tratamiento AntiBotrytis
Testigo natural	10	0
Abrevado	55	22
Abrigado	0	0
Lastimado	50	-----
Total	22	7

Tabla 3: influencia de la humedad y de los tratamientos anti-Botrytis sobre la presencia de *Brettanomyces* en la uva.

CONCLUSIÓN

Nuestros trabajos han demostrado y confirmado que *Brettanomyces* está presente en la uva y que diferentes factores ambientales, que influyen en la integridad de la baya, tienen también una influencia sobre la presencia de este contaminante en el seno del viñedo. La selección de racimos en la viña y la disminución de todos los factores susceptibles de dañar las uvas, son importantes para limitar la presencia de *Brettanomyces* en la materia prima. Los resultados de este trabajo muestran la necesidad de la caracterización de parcelas de riesgos microbiológicos. La higiene, factor considerado durante mucho tiempo como única fuente de contaminación, es en efecto la causa mayor de mantenimiento de los contaminantes de un año al otro a lo largo de la cadena de producción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBIN P., 2006. Maîtrise de la contamination des vins rouges par *Brettanomyces* au cours des procédés de vinification. Thèse, INP Toulouse, France

BARBIN P., STREHAIANO P., TAILLANDIER P. ET GILIS J.-F., 2007. Méthodologie de dépistage et d'isolement de *Brettanomyces* sur le raisin : application à l'échelle parcellaire. Revue des CEnologues. 124, 57-60.

FROUDIERE I., LARUE F., 1988. Conditions de survie de *Brettanomyces* (*Dekkera*) dans le moût de raisin et le vin. Connaissance de la Vigne et du Vin, 2, pp296-303.

GANGA M.A., MARTINEZ C., 2003. The use of commercial *Saccharomyces* spp. in winemaking and its influence on biodiversity of indigenous non *Saccharomyces* yeast. 7ème Symposium International d'œnologie, Arcachon France.

GILIS J.F., 1999. Etude de contamination de fermentations alcooliques industrielles par les levures *Brettanomyces*. Thèse, INP Toulouse, France

PEYNAUD E., DOMERCQ S., 1956 Sur les *Brettanomyces* isolés de raisins et de vins. Arch. Für Mikrobiol., 24(8), pp266-280.

ROSE A.H., HARRISON J.S., 1971 in The Yeast, vol.2, Academic Press (ed), 1ère ed, London, pp3-73

WRIGHT J.M. et PARLE J.N., 1973. N.Z. J. of Agric Research., 17 : pp. 273-278.

Recibido: Enero 2008

Aceptado: Marzo 2008



NDLR: Trabajo presentado en el “XI Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología”, 26 al 30 de Noviembre de 2007, Mendoza, Argentina.
Si desea contactarse con alguno de sus autores, comuníquese a enologia@revistaenologia.com