

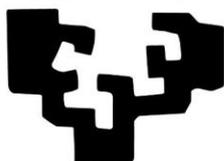
## Trabajo de Fin de Grado:

# IDENTIFICACIÓN DE LA LEVADURA ALTERANTE

## PICHIA MEMBRANAEFACIENS EN EL VINO.

---

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

FARMAZIA  
FAKULTATEA  
FACULTAD  
DE FARMACIA

---

Alumna: Eva María González Sáiz

Directora: Leixuri Aguirre

Grado de Ciencia y Tecnología de los  
Alimentos

Facultad de Farmacia, UPV/EHU

## **ÍNDICE:**

<b>Resumen.....</b>	<b>0</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>2</b>
<b>3. Desarrollo.....</b>	<b>2</b>
<b>3.1. Contextualización .....</b>	<b>3</b>
<b>3.2. Materiales y métodos .....</b>	<b>3</b>
<b>3.3. Resultados y discusión.....</b>	<b>9</b>
<b>3.4. Conclusiones .....</b>	<b>21</b>
<b>4. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>22</b>

## **Resumen.**

Actualmente está aumentando mucho la importancia que está adquiriendo la levadura alterante *Pichia membranaefaciens*, ya que se empieza a conocer que en algunos casos es el microorganismo responsable de la alteración organoléptica de algunos vinos, produciendo olores, apariencias y sabores no aceptados por el consumidor. La detección de dicha levadura es de importancia debido a la tendencia actual del consumidor hacia alimentos de mayor calidad.

En este trabajo se ponen en estudio se analizan diferentes medios de cultivo para evaluar cuál es el más adecuado para el crecimiento e identificación de esta levadura, para así obtener una técnica de identificación rápida y eficiente, y poner en conocimiento de los productores quien es el microorganismo responsable y emplear medidas adecuadas para solucionar los defectos causados por este microorganismo. Además, se detalla en este estudio las pruebas de confirmación empleadas para asegurar que las colonias crecidas en esos medios de cultivo realmente son el microorganismo buscado.

## 1. Introducción.

En el proceso de elaboración del vino hay muchos factores que influyen sobre su calidad final, tanto físicos, químicos como microbiológicos. En el ámbito microbiológico, se ha descubierto recientemente la influencia de la levadura *Pichia membranaefaciens*, debido a la aparición de defectos sensoriales olfativos y visuales (mal olor y enturbiamiento respectivamente) en el producto final de algunas bodegas, debido a que es capaz de crecer tanto en el depósito del vino como en la superficie en la bodega. <sup>[1, 2]</sup>

*P. membranaefaciens* es una levadura aerobia y, normalmente, débilmente fermentativa, cuya temperatura óptima de crecimiento es cercana a los 27 °C y su pH adecuado es ácido, concretamente de 4,5 a 6,5. Tolera hasta un 10% (máximo 13%) en volumen de etanol, pero no tolera ninguna cantidad de dióxido de azufre libre (SO<sub>2</sub> libre). <sup>[1, 3, 4]</sup>

Presenta fuentes de origen muy variadas, aunque las más importantes son la propia uva y los equipos de las bodegas. Además, dicha levadura, coloniza el ambiente donde se encuentre muy rápidamente por dos motivos: su metabolismo oxidativo, tanto en los vinos que se encuentran en depósitos sin llenar completamente como en las superficies contaminadas con residuos de vino <sup>[2]</sup>, y por su capacidad de producir toxinas killer, capaces de matar otras levaduras y hongos sensibles, con las cuales compite por su proliferación, facilitando su crecimiento. <sup>[5]</sup> Esta levadura crece como colonias de color blanco, opacas, de lisas a arrugadas y con un margen lobulado, además, según el medio donde se desarrolle, puede provocar un ligero olor ácido debido a la fermentación que realiza para su crecimiento. <sup>[6]</sup>

Esta levadura provoca esos olores defectuosos debido a una producción excesiva de compuestos fenólicos (4-etilguayacol y 4-etilfenol, que dan olor a establo o sudor de caballo) y debido a su capacidad de formación de biofilms, es decir, su capacidad de organizarse formando una red que da lugar a una película blanca grisácea en el vino. Anteriormente se atribuía estos defectos principalmente a *Brettanomyces*. <sup>[7, 8]</sup>

Además, en las muestras de vino que se emplean en este estudio, la fermentación se realiza de forma espontánea (no inoculada), lo que involucra varias especies microbianas que actúan de forma sucesiva (*Pichia*, *Candida*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Saccharomyces*, ...) y que producen alcoholes y ésteres con fuerte influencia en las propiedades sensoriales. <sup>[4, 9]</sup>

Por estas razones, el análisis microbiológico gana aún más importancia de la que ya tiene, ya que si se conoce cuál es el microorganismo responsable de los defectos originados y se dispone de un método nuevo, eficiente y rápido para su detección, se podrán tomar las medidas correctoras pertinentes en cada caso. Otra razón que cabe destacar y otorga importancia a este estudio es que, actualmente, los medios de cultivos y las sondas empleadas para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), solo detectan de forma específica a *Brettanomyces*, y la única forma disponible de identificar a *Pichia membranaefaciens* es realizar una secuenciación genómica a las colonias sospechosas.

## **2. Objetivos.**

El objetivo general de este trabajo de fin de grado fue conseguir un método eficiente y rápido para la identificación de la levadura alterante *Pichia membranaefaciens*. Y los objetivos específicos de este trabajo fueron:

- Obtener una descripción morfológica macroscópica y microscópicamente.
- Realizar una comparación del crecimiento de dicha levadura entre los medios de cultivo escogidos.
- Efectuar una confrontación entre las diferencias de la morfología de la cepa pura y la cepa de las muestras de vino.
- Comprobar que se trata de nuestro microorganismo de interés mediante la realización de pruebas bioquímicas a las colonias y la secuenciación genómica.

## **3. Desarrollo.**

La investigación se ha realizado siguiendo las normas UNE-EN ISO correspondientes, concretamente ISO 17025:2017 sobre requisitos generales en laboratorios de ensayo y calibración, UNE-EN ISO 11133:2014 sobre microbiología de alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua: preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo, y UNE-EN ISO 7218:2008 sobre microbiología de alimentos para consumo humano y alimentación animal: requisitos generales y guía para el examen microbiológico. Además, también se realizó siguiendo los procedimientos normalizados de trabajo (PNT) e instrucciones técnicas (IT) elaboradas por el laboratorio. <sup>[10,</sup>

11]

### 3.1. Contextualización.

Este estudio ha sido realizado en los laboratorios de Dolmar Innova S.L., concretamente en el área de microbiología la cual, desde el año 2010, posee la acreditación de ENAC, conforme a la norma UNE-EN ISO pertinente. <sup>[12,13]</sup>

La idea de este estudio surgió a partir de unas muestras de vino que llegaron para analizar al Laboratorio Dolmar S.L., en las cuales se detectó un aumento significativo de fenoles volátiles en un análisis rutinario, aumentando de 32 µg/L en octubre a 482 µg/L en noviembre, siendo su umbral de 440 µg/L. La bodega productora pidió revisar los resultados y empezaron a sospechar que las muestras no se tomaban del fondo de la bodega, sino de la zona intermedia de la bodega. Se volvió a muestrear en el fondo de la bodega, y entonces se empezó a ver el crecimiento de unas levaduras diferentes a las habituales y una cantidad de 836 µg/L. Se observó en el microscopio la formación de unas cadenas que unían las propias levaduras.

En el análisis se observó que la apariencia macroscópica (de las colonias), la apariencia a nivel microscópica y los defectos de olor informados, no concordaban con la información que se poseía del microorganismo que se creía responsable (*Brettanomyces*) de los problemas que había informado esta bodega. Como en todos los aspectos nombrados había diferencias significativas (olor producido, forma, tamaño y viscosidad de la colonia, apariencia al microscopio, pruebas bioquímicas, ...) y se sospechaba que no se trataba de *Brettanomyces*. Por ello el laboratorio mandó realizar una secuenciación genómica a este tipo de colonias, resultando ser *Pichia membranaefaciens* la levadura responsable. Posteriormente, en otras muestras, también se ha observado este microorganismo.

Por consiguiente, se decidió realizar este estudio y así, realizar una identificación adecuada de dicha levadura y las empresas podrán subsanar correctamente los defectos ocasionados.

### 3.2. Materiales y métodos.

Reconstitución de la cepa de referencia: la cepa de referencia es un microorganismo obtenido directamente de una colección de cultivos, en este caso de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), y está definido como mínimo a nivel de género y especie, catalogado y descrito acorde a sus características y preferiblemente procedente de productos alimenticios para consumo humano o animal, de un entorno de producción de alimentos de consumo humano o animal, o de agua según corresponda.

La cepa recibida fue la CECT 1115, la cual se recibió liofilizada. Para su utilización, se reconstituyó en el caldo de cultivo estéril adecuado indicado por la CECT (CECT 138, caldo o medio líquido levadura malta, LM). Para ello primero se preparó el medio de reconstitución, como se indica posteriormente, cuando este medio ya estaba esterilizado, se añadió la cepa a un tubo de ensayo con 10 mL del medio y se incubó en una estufa a 27 °C durante 24 horas para obtener la cepa de trabajo, la cual se considera la dilución  $10^{-1}$  ufc/mL.

Después de dicha incubación se realizó una dilución seriada de la cepa de trabajo, desde la dilución inicial hasta la dilución  $10^{-8}$  ufc/mL en el medio líquido de levadura-malta (caldo LM), para así obtener diferentes concentraciones para la realización del ensayo. <sup>[10]</sup>

Para la observación al microscopio de las colonias obtenidas se emplearon una muestra de 5 µL de vino de la superficie (cantidad de un asa de siembra), y una muestra de 50 mL del vino en profundidad, que se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos para concentrar la población microbiana. Además, se realiza una tinción de Gram para la observación de algunas colonias.

Capacidad formadora de biofilms: se realiza una prueba para comprobar si, una muestra de 50 mL del vino introducida en un matraz Erlenmeyer tapado e incubada a 30 °C, presenta capacidad de desarrollo de biofilms debido a la presencia de *Pichia membranaefaciens*. <sup>[14]</sup>

Respecto a los medios de cultivo empleados fueron:

Agar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC), el cual es un medio selectivo para la enumeración y aislamiento de mohos y, en menor medida de levaduras, en alimentos. En el laboratorio se emplea el medio comercial (Condalab, Ref: 0833) y su composición es: 5 g/L de peptona, 10 g/L de glucosa, 1 g/L de fosfato monopotásico, 0,5 g/L de sulfato magnésico, 0,002 g/L de dicloran, 0,1 g/L de cloranfenicol, 0,025 g/L de rosa de bengala y 15 g/L de agar bacteriológico.

Agar extracto de levadura y malta (YM) es un medio selectivo para el aislamiento y enumeración principalmente de levaduras y, aunque en menor medida, de mohos en alimentos. El medio del que se dispone es comercial (Scharlab, ref: 01-219-500) cuya composición consta de 5 g/L de peptona, 3 g/L de extracto de levadura, 3 g/L de extracto de malta, 10 g/L de glucosa y 20 g/L de agar bacteriológico. Después de su esterilización, cuando se van a elaborar las placas Petri se le añaden 0,08 g/L de bifenilo y 0,25 g/L de cloranfenicol para la inhibición de bacterias.

Caldo de cultivo levadura-malta (caldo LM) se trata de un medio líquido de reconstitución óptimo para *Pichia membranaefaciens* proporcionado por CECT (Ref: CECT 138). Este medio se elabora manualmente en el laboratorio y su composición es de 10 g/L de glucosa, 5 g/L de peptona, 3 g/L de extracto de levadura, 3 g/L de extracto de malta, y para su forma en agar 20 g/L de agar.

Agar levadura malta (LM) se trata de un medio específico para levaduras. Este medio se elabora manualmente en el laboratorio y su composición (proporcionada por CECT, Ref: 1115) es de 10 g/L de glucosa, 5 g/L de peptona, 3 g/L de extracto de levadura, 3 g/L de extracto de malta, y para su forma en agar 20 g/L de agar.

Agar levadura malta con inhibidores (LM inh) es el medio LM, pero antes de su uso se le añade al medio 0,08 g/L de penicilina y 5 g/L de pimarcina, previamente disueltos en 20 mL de etanol al 96% para que sea aséptico y no contamine el medio al añadirlo.

El medio líquido Sniff Brett consiste en un medio líquido, creado por el laboratorio Dolmar Innova S.L., en el que se realiza una siembra de la muestra de 20 mL para comprobar la presencia de levaduras que son capaces de producir etil-fenoles en el vino inicial, y para conocer la cantidad de dichas levaduras, en función de los días necesarios para la aparición de esos olores característicos. Se debe ir comprobando su olor cada 2 días.

Agar Plate Count (PCA) es un medio estándar de crecimiento de microorganismos, también usado para el aislamiento de colonias. En el laboratorio se dispone del medio comercial (PanReact AppliChem, Ref: 413799) y su composición consta de 1 g/L de glucosa, 2,5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de peptona y 15 g/L de agar.

Agar dextrosa sabouraud con cloranfenicol (sabouraud o SDA) es un medio selectivo empleado para el aislamiento de levaduras y mohos de muestras biológicas (alimentarias) que presentan una flora mixta de hongos y bacterias. Este medio es comercial (PanReact AppliChem, Ref: 413842), y su composición está formada por 10 g/L de peptona, 15 g/L de agar y 40 g/L de glucosa. Después de su esterilización, cuando se vayan a emplear las placas Petri, previamente se le añade al medio 0,05 g/L de cloranfenicol, que es un antibiótico estable al calor de amplio espectro, disuelto en 20 mL de etanol 98%.

Agar *Brettanomyces* (Brett) es un medio específico utilizado para la detección de levaduras, como *Brettanomyces*, en muestras de vino, mezclas enológicas, agua, y alimentos. Se

elabora en el propio laboratorio y su composición consta de 20 g/L de glucosa, 10 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de peptona, 20 g/L de agar, 0,1 g/L de ácido p-cumárico, 0,1 g/L de ácido *trans*-ferúlico 0,1 g/L de cloranfenicol, y después de su esterilización, cuando se vayan a utilizar las placas Petri, previamente se le añade al medio, mediante filtración, 0,065 g/L de cicloheximida disuelta en 20 mL de etanol 98%.

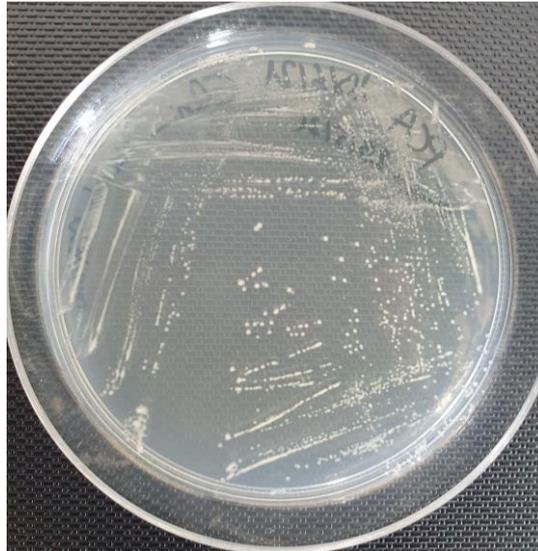
Agar extracto de levadura peptona dextrosa (YPD) es un medio sólido, complejo y selectivo para el crecimiento de levaduras. Se elabora en el laboratorio con la siguiente composición: 20 g/L de glucosa, 20 g/L de peptona, 10 g/L de extracto de levadura y 15 g/L de agar.

Agar extracto de malta extracto de levadura glucosa peptona con cobre (MGYP) es un medio selectivo recomendado para el aislamiento de levaduras silvestres, idóneo para detectar *Pichia*, entre otros microorganismos. Se realiza en el laboratorio siendo su composición 20 g/L de agar, 10 g/L de glucosa, 5 g/L de peptona, 3 g/L extracto de levadura, 3 g/L extracto de malta y 0,4 g/L de sulfato de cobre II.

Agar lisina (AL) es un medio selectivo y diferencial para la enumeración y aislamiento de levaduras que presentan la característica de ser lisina descarboxilasa positivas, discrimina entre *Saccharomyces* y especies no pertenecientes a este género, como *Pichia*. Se empleó un medio comercial (Scharlab, Ref: 064-BA1191) cuya composición consta de 44,5 g/L de glucosa, 17,8 g/L de agar, 1 g/L de lisina, 1,78 g/L de dihidrógeno fosfato potásico, 0,89 g/L de sulfato de magnesio, 0,178 g/L de cloruro cálcico, 0,089 g/L de cloruro de sodio, 0,02 g/L de inositol, 0,00815 g/L de suplementos, 8,9 µg/L de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2 µg/L de biotina, 1 µg/L de ácido fólico, 10 mL/L de lactato potásico al 50% y 1 mL/L de ácido láctico al 10%.

Las técnicas de siembra empleadas fueron:

Siembra de agotamiento por estrías: es un procedimiento de siembra que evalúa la capacidad del medio para permitir el crecimiento y aislamiento de los microorganismos deseados, mediante un agotamiento progresivo y continuo del inóculo (Figura 1). <sup>[11, 15]</sup>



**Figura 1: Siembra de agotamiento por estrías.**

Siembra en superficie: es una técnica que consiste en sembrar la muestra, 1 mL si es en placa Petri grande y 0,1 mL si es placa Petri pequeña. Se siembra sobre el agar correspondiente, siguiendo las condiciones de esterilidad, y se extiende con un asa estéril por todo el agar para que quede repartido de forma homogénea. <sup>[11, 15]</sup>

Siembra en profundidad: es un método de siembra que consiste en depositar con una pipeta 1 mL de la muestra en la placa Petri estéril, y después, se añaden encima 15 mL del agar atemperado que se vaya a utilizar, mezclando ambos componentes homogéneamente antes de que gelifique. <sup>[11, 15]</sup>

En relación a las pruebas bioquímicas que se le realizó a esta levadura fueron:

Prueba de la catalasa: consiste en identificar si el microorganismo posee la enzima catalasa, la cual reacciona con el peróxido de hidrógeno (o agua oxigenada,  $H_2O_2$ ) formando agua y oxígeno (Scharlab, Ref: 064-CL0234). <sup>[16]</sup>

Prueba de la Oxidasa o Citocromo C oxidasa: se basa en la identificación de enzimas oxidadas, concretamente en la presencia de la citocromo C oxidasa, la cual activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno (Scharlab, Ref: 06-120-050). <sup>[16]</sup>

Prueba de descarboxilación de la lisina: se realiza con dos métodos, la prueba rápida comercial API 20C Aux (Biomerieux, Ref: 20 210) (Figura 2), y con el agar de lisina anteriormente mencionado, y si son capaces de crecer en este medio, significa que ese

microorganismo tiene la capacidad de metabolizar la lisina como única fuente de nitrógeno. [17]

Prueba de la sulfito reductasa (H<sub>2</sub>S): esta enzima cataliza la reacción de reducción del sulfito (SO<sub>3</sub><sup>-2</sup>) a sulfuro (S<sup>-2</sup>) mediante la transferencia de 6 electrones suministrados por la ferredoxina. Se realizará mediante la prueba rápida comercial API 20C Aux (Biomerieux, Ref: 20 210). [18, 19]

Prueba de la urea o ureasa: consiste en determinar la presencia de la ureasa, la cual es una enzima que descompone la urea originando amonio. Se llevará a cabo mediante la prueba rápida comercial Galería API 20C Aux (Biomerieux, Ref: 20 210). [20]

Prueba del indol: se basa en la detección del indol, el cual se libera por la degradación del triptófano mediante la triptofanasa, ese indol se detecta con la adición del reactivo de Kovacs. Se realizará mediante la prueba rápida comercial API 20C Aux (Biomerieux, Ref: 20 210). [21]

Prueba de ácido glucosa o β-glucosidasa: consiste en identificar la presencia de la β-glucosidasa mediante su actuación sobre la glucosa por una fermentación produciendo ácido pirúvico. Se realizará mediante la prueba rápida comercial API 20C Aux (Biomerieux, Ref: 20 210). [21]



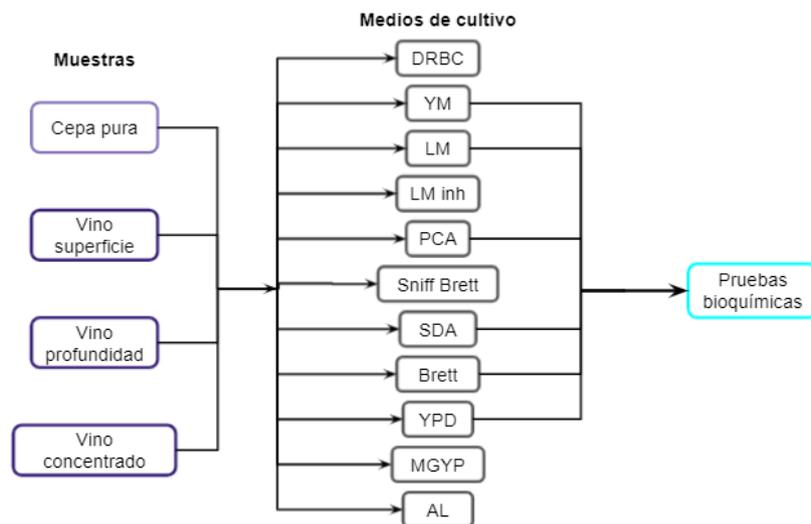
**Figura 2:** Prueba API 20C Aux (Biomerieux, Ref: 20 210). Donde se realizaron las pruebas de lisina descarboxilasa, sulfito reductasa; ureasa, indol y β-glucosidasa.

**LDC:** lisina descarboxilasa; **H<sub>2</sub>S:** sulfito reductasa; **Ure:** ureasa; **Ind:** prueba del indol; **Glu:** β-glucosidasa.

Se empleó la secuenciación genómica de las colonias crecidas en los medios, sospechosas de ser *Pichia membranaefaciens*. Esta secuenciación masiva se realizó por una entidad externa, que es el Centro de Investigación Biomédica de la Rioja (CIBIR), y consiste en determinar la secuencia de bases de los nucleótidos (adenina, timina, guanina y citosina) de un fragmento de ADN de una muestra a partir del ARNr (ARN ribosómico) y compararlo con la base de datos para saber a qué microorganismo pertenece. [21]

### 3.3. Resultados y discusión.

A continuación, se detallarán y compararán los resultados de las diluciones empleadas de la cepa pura de *Pichia*, y los resultados de la cepa de *Pichia* presente en las muestras de vino. Las muestras del vino fueron tomadas de la superficie del vino, de la profundidad de la botella homogeneizada y una muestra del vino homogeneizado concentrado mediante una centrifugación (Figura 3).



**Figura 3:** Esquema del proceso donde se detallan las muestras analizadas, los medios de cultivo empleados. En los medios donde el crecimiento fue óptimo se seleccionaron para las pruebas bioquímicas.

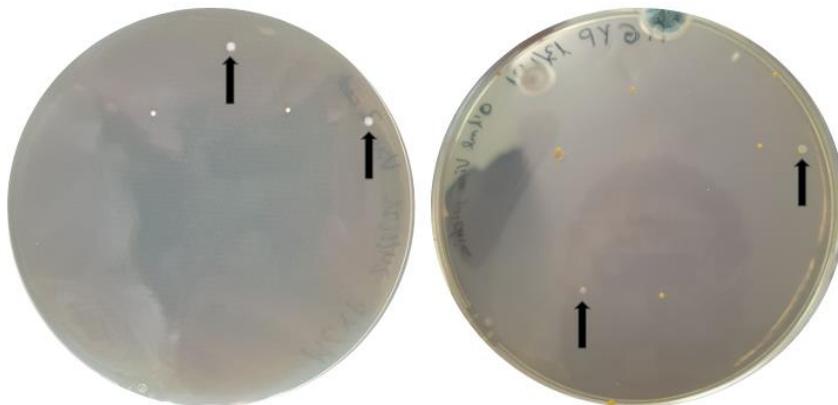
**DRBC:** agar dicloran rosa bengala cloranfenicol; **YM:** agar extracto de levadura y malta; **LM:** agar levadura-malta; **LM inh:** agar levadura-malta con inhibidores; **PCA:** agar plate count; **SDA:** agar sabouraud; **Brett:** *Brettanomyces*; **YPD:** agar extracto de levadura peptona dextrosa; **MGYP:** agar extracto de malta extracto de levadura glucosa peptona con cobre; **AL:** agar lisina.

En relación a la observación macroscópica de las colonias, se obtuvieron diversos resultados. Por una parte, en las siembras de todas las diluciones de la cepa pura se obtuvieron dos tipos de colonias: un tipo fue de colonias amarillas, opacas, lisas, brillantes, con elevación circular y de borde regular, correspondiente a bacterias. El segundo tipo correspondió a colonias blancas, opacas, rugosas, normalmente centralizadas, con elevación volcánica, gelatinosas y de borde regular (Figura 4). Dicho segundo crecimiento aparentemente corresponde a *Pichia*. En el caso de las siembras de vino, tanto de superficie, como de profundidad y concentrado, se obtuvieron resultados muy variados, ya que hubo casos de crecimiento de mohos y de bacterias. Se obtuvieron dos tipos de colonias blancas, un tipo era con la misma morfología que las descritas en el caso de las diluciones de cepa pura. El segundo tipo fueron

colonias blancas, translúcidas, lisas, centralizadas, con elevación circular, gelatinosas y de borde normalmente regular (Figura 5). Este segundo tipo de colonia blanca, visualmente se correspondió con otra cepa de *Pichia*.



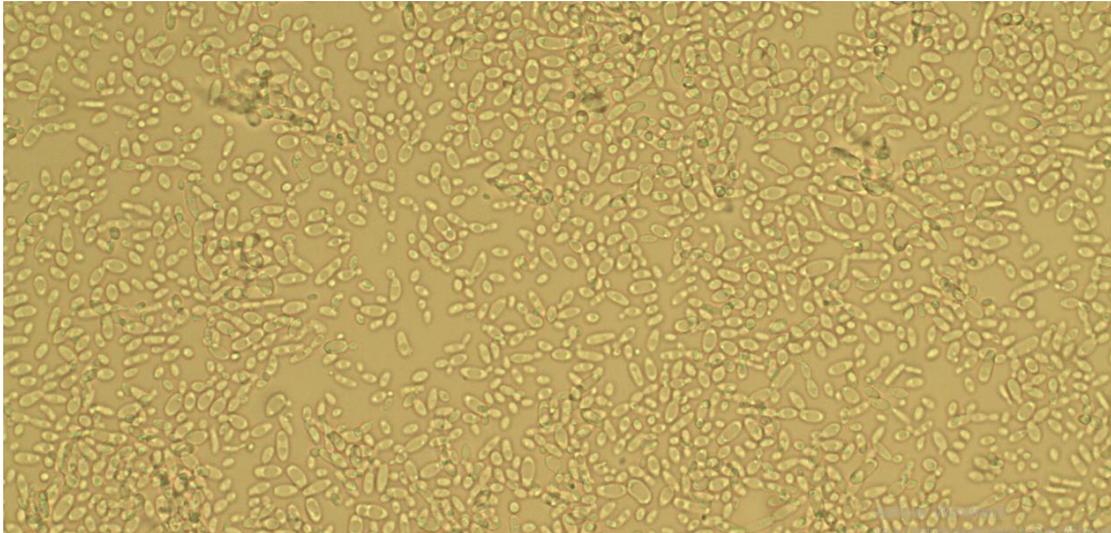
**Figura 4:** Primera cepa de *Pichia*: colonias rugosas.



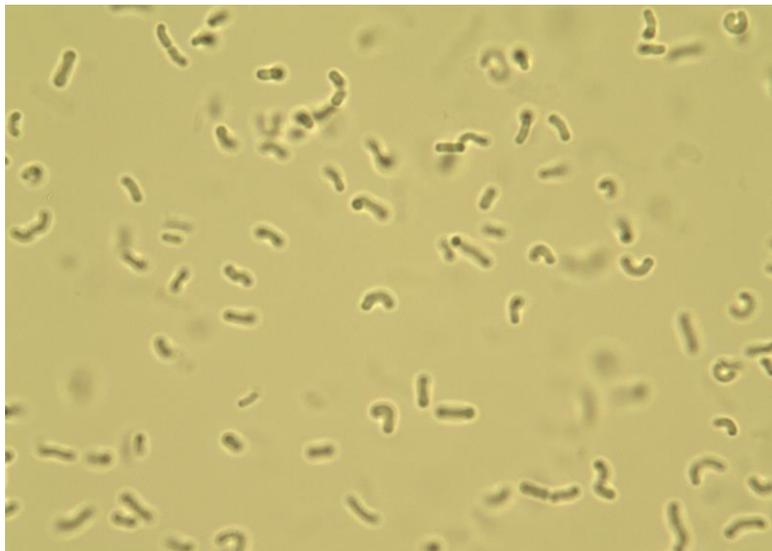
**Figura 5:** Segunda cepa de *Pichia*: colonias lisas.

Respecto a la observación al microscopio de la muestra de superficie del vino se pudo observar que, como es lógico, había una cantidad enorme de bacterias, pero también se podía observar algunas levaduras con aspecto típico de *Pichia membranaefaciens*. En el caso de la muestra concentrada y de profundidad del vino, se observó una gran población de levaduras, las cuales también concordaban aparentemente con *Pichia*. Se comprobaron al microscopio las colonias de cada medio sospechosas de corresponder a dicho microorganismo, las cuales se dividieron en dos tipos: el primer tipo corresponde a colonias blancas, opacas, rugosas, gelatinosas con elevación volcánica y de borde regular. En este primer tipo se observó que las levaduras presentaban una forma apiforme, con un núcleo grande y nítido, con yemas, segmentadas, en muchas ocasiones agrupadas y de tamaño variable entre la cepa pura y la del vino (Figura 6). El segundo tipo fue de colonias blancas, translúcidas, lisas, gelatinosas, con elevación circular y de borde normalmente regular. En

este segundo tipo de colonia, se observaron características celulares similares a excepción de su forma, la cual era torcida y más delgada, y su núcleo, el cual no se observó nítidamente (Figura 7).



**Figura 6: Primera cepa de *Pichia*: colonias rugosas.**



**Figura 7: Segunda cepa de *Pichia*: colonia lisa.**

Respecto a la prueba de capacidad formadora de biofilms en el vino, se realizó con la muestra de profundidad. Se obtuvo un resultado positivo, ya que se pudo observar la aparición de una película blanquecina, de anchura irregular y rugosa que abarcó toda la superficie del vino. Debido a esta aparición se concluyó que dicha levadura presenta capacidad de formar biofilms.

En el medio de DRBC se realizaron siembras en superficie de las diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  ufc/mL de la cepa pura. Se realizó la elección de estas diluciones porque correspondían a un crecimiento adecuado y diferenciado para poder apreciar bien sus características visuales. El crecimiento se consideró óptimo, ya que si se obtuvo una formación de colonias cuya cantidad varió de 90 a 4.850 ufc/mL. En cambio, en el caso de las siembras de vino, mediante una siembra en superficie del vino de superficie y de profundidad, y una siembra por estría de las muestras concentradas, no se obtuvo ningún crecimiento significativo. Por lo tanto, este medio queda descartado debido a que no permite el crecimiento de las colonias de *Pichia* a partir de muestras de vino.

Respecto al medio YM se realizaron las mismas siembras, con las mismas muestras que en el medio anterior, y se obtuvieron buenos crecimientos en todas las siembras. Las colonias obtenidas en este medio fueron blancas, opacas, rugosas, centralizadas, regulares y elevadas con forma volcánica, características de *Pichia*. A pesar de los buenos crecimientos, este medio fue descartado debido a que solo fue capaz de crecer un tipo de dicha levadura de las dos que fueron observadas en el microscopio, y solo si se presenta en concentraciones más altas.

En el agar LM, respecto a las diluciones de la cepa  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  ufc/mL hubo un crecimiento óptimo, el cual varió desde 90 ufc/mL hasta una cantidad incuantificable debido a que presentó un crecimiento excesivo con colonias muy pequeñas y juntas. En algunas placas se produjo una invasión completa por mohos y hubo un crecimiento excesivo de bacterias. En relación a las siembras del vino, el resultado fue incuantificable debido a un crecimiento excesivo de colonias que no se diferenciaban unas de otras y con crecimientos muy diversos que impedían su visualización. Por ello se concluyó que este medio no era adecuado debido al crecimiento de una única cepa y la elevada posibilidad de la invasión por mohos y bacterias.

Respecto al medio LM inh, de la cepa pura se sembraron las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  ufc/mL, con las cuales se obtuvo, principalmente, un crecimiento de una masa amarilla uniforme en toda la superficie del medio, el cual correspondía a bacterias. En estas diluciones se produjo una pequeña excepción, ya que en la dilución  $10^{-1}$  ufc/mL se produjo un pequeño crecimiento de nuestra levadura de interés. En relación a la siembra de las muestras, de superficie, profundidad y concentrada, del vino, se obtuvieron dos tipos de crecimientos, el primer crecimiento fue correspondiente a la misma masa amarilla mencionada anteriormente. El segundo crecimiento fue débil, de colonias blancas, pequeñas y lisas, las cuales se correspondieron con *Pichia*. En este caso se decidió descartar este medio debido a la

tendencia a ser colonizado por bacterias y capacidad reducida de crecimiento para nuestra levadura de interés.

En el medio líquido Sniff Brett, concretamente en el caso de la muestra de vino de profundidad, obtuvimos un resultado positivo en 8 días, indicado por el olor originado por la producción de fenoles y la turbidez que presentaba. En el caso de las diluciones, de las cuales se sembraron todas desde la  $10^{-1}$  ufc/mL hasta la  $10^{-8}$  ufc/mL, y en primer lugar se obtuvo la aparición de turbidez en todas las muestras y posteriormente, se originó ese olor defectuoso propio de un aumento excesivo de fenoles al cabo de mes y medio, obteniendo un resultado positivo. Este medio fue útil para saber si esta levadura era la responsable de los mismos defectos que se ocasionaron en el vino, pero quedó descartado debido a que no es de utilidad para inspeccionar la morfología de su colonia ni su apariencia al microscopio.

En el agar PCA se realizaron siembras en superficie de las diluciones de cepa pura  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  ufc/mL, con las cuales se obtuvo un buen crecimiento el cual varió de 4 a 87 ufc/mL. Se realizó la siembra de una muestra del medio Sniff Brett con vino, que previamente resultó positiva en *Pichia*, con la cual se obtuvo un crecimiento aceptable de colonias de nuestra levadura de interés, pero no bien diferenciadas. Respecto a la siembra en superficie de muestras de vino, de superficie y de profundidad, se obtuvo un buen resultado ya que aparecieron colonias blancas aisladas y regulares (junto con otros crecimientos), aunque algunas eran poco visibles. Para la muestra de vino concentrada que fue sembrada por estría, se obtuvo el mismo crecimiento, pero en mayor cantidad. En el caso de este medio también se realizó la siembra por estría de colonias procedentes de los medios LM, YPD y Brett (sembrados previamente con una muestra de vino de profundidad), a partir de las cuales se obtuvo un buen aislamiento, crecimiento y diferenciación de las colonias blancas, pequeñas, regulares y lisas. Posteriormente, se realizó una siembra de una colonia blanca-amarillenta crecida en una placa de MGYD sembrada con vino, de la cual obtuvimos colonias típicas y vistas anteriormente correspondientes a *Pichia*. Para este agar, se llegó a la conclusión de que fuera descartado, debido a que, para el vino, sólo era adecuado para realizar el aislamiento de colonias ya confirmadas procedentes de otras placas. Además, para una siembra en superficie en este medio, solo se produjo crecimiento de la cepa pura.

En el medio SDA se realizó una siembra en profundidad y otra en superficie de las diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-6}$  ufc/mL de la cepa pura, obteniendo en la placa en profundidad de  $10^{-6}$  ufc/mL una invasión por mohos. En cambio, en la siembra en superficie de  $10^{-6}$  ufc/mL, se obtuvo un buen crecimiento con colonias bien diferenciadas, blancas, de un tamaño aceptable, rugosas y regulares. En las placas de  $10^{-4}$  ufc/mL, se produjo un resultado incuantificable, ya que hubo

muchísimo crecimiento ( $> 500$  ufc/mL), sin diferencia entre las colonias y muy pequeñas. Respecto a la siembra en este medio con las muestras de vino, tanto de superficie, como en profundidad y como concentrado, se obtuvo un crecimiento elevado, con muchas colonias blancas, pequeñas y regulares con elevación. Además de la aparición de mohos invasores en la mayoría de placas, en algunas de estas muestras de vino se obtuvieron colonias ligeramente distintas las cuales eran lisas, blancas, brillantes, regulares y con elevación. Este agar fue descartado debido a la elevada contaminación de mohos por toda la placa.

Respecto al agar Brett, en la siembra en profundidad de las diluciones de cepa pura  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  ufc/mL, resultó no ser cuantificable, debido a la presencia de muchas colonias juntas y a la invasión por mohos, respectivamente. En el caso de la siembra en superficie de estas mismas diluciones, en el caso de  $10^{-5}$  ufc/mL se obtuvo un resultado incuantificable por el exceso de colonias, en el caso de  $10^{-6}$  ufc/mL se obtuvieron colonias similares a las anteriores, es decir, blancas, opacas, muy bien diferenciadas, bastante grandes, con una elevación volcánica muy pronunciada, rugosas, centralizadas y de borde regular. En una de las siembras en superficie de las muestras de vino de profundidad, en una se produjo la invasión de la placa por mohos. En el resto de las muestras con esta misma siembra en superficie, con vino de profundidad, se produjo la aparición de pequeños mohos y el crecimiento adecuado cuyas colonias eran blancas opacas, algunas rugosas y otras lisas, con elevación, centralizadas y de borde regular. En el caso de la siembra por estría de la muestra de superficie y la concentrada del vino, se obtuvo el mismo tipo de colonias que se acaba de describir. Este medio fue descartado debido a la facilidad de crecimiento de los mohos para invadir la placa, y cuando había crecimiento era de colonias pequeñas.

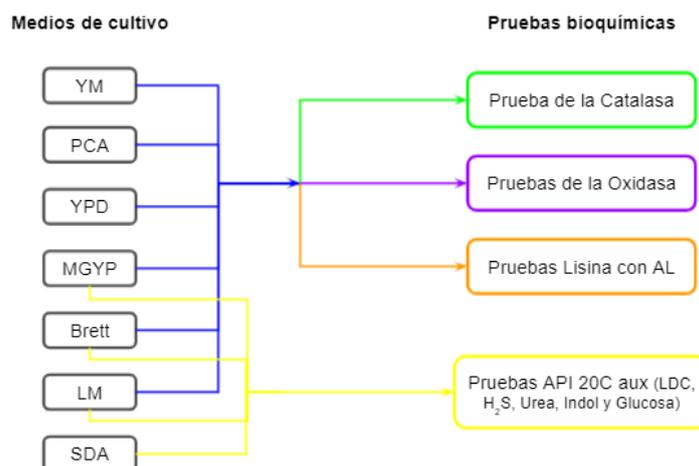
En el caso del medio YPD, respecto a las muestras de la cepa pura, se realizó la siembra de las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  ufc/mL, se obtuvieron un crecimiento incuantificable y un crecimiento adecuado respectivamente. En ambas placas las colonias eran blancas, rugosas, regulares, con elevación, volcánicas y, a diferencia del resto de casos, presentaban mayor extensión. En la siembra en superficie de las muestras de vino, de superficie y profundidad, y la siembra en estrías de la muestra concentrada, hubo algunos casos de invasión de la placa por mohos, pero en el resto se produjo un crecimiento notable de pequeñas colonias de ambos tipos de *Pichia*, y el crecimiento de colonias amarillas lisas de bacterias. Un tipo fueron colonias blancas, rugosas, opacas, extensas, con una ligera elevación volcánica y de bordes regulares. El otro tipo fue de colonias blancas, translúcidas, lisas, centralizadas, con elevación circular y de borde regular. Para este medio se concluyó que era una opción bastante viable, ya que presentó un crecimiento adecuado de las dos colonias, pero entre otras causas, se

descartó como mejor medio por la posible invasión de mohos y bacterias, además de la ligera diferencia visual mencionada de la extensión de las colonias.

En relación al medio MGYP, en las siembras en superficie de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  ufc/mL de la cepa pura, se obtuvo un crecimiento muy bueno de colonias correspondientes a *Pichia*. Además de colonias amarillas de bacterias, las colonias de la levadura de interés fueron blancas, opacas, rugosas, con cierta elevación volcánica, agrupadas y de borde regular. Con la siembra en superficie de una muestra del Sniff positivo sembrado con vino, se obtuvo un crecimiento muy débil de las mismas colonias que en el caso anterior. Respecto a las siembras en superficie con muestras de vino de superficie y profundidad, y siembra por estrías de la muestra concentrada, se originó un crecimiento muy variado de colonias, entre las que se encuentran dos tipos de las colonias de interés, el primer tipo fue de colonias blancas, rugosas, opacas, centralizadas, con cierta elevación volcánica y regulares. El segundo tipo de estas colonias fueron blancas, translúcidas, lisas, superficie con elevación redonda y de bordes regulares (alguna excepción de irregulares). Además, creció algunas colonias de color amarillo y marrón, lisas con poca elevación y regulares, correspondientes a bacterias. La conclusión tomada respecto a este medio fue que se consideró un medio óptimo para la identificación de dicha levadura a partir de vino.

En el medio AL, se realizó una siembra superficial de las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-6}$  ufc/mL de la cepa pura, con las que se obtuvo un crecimiento abundante de colonias blancas, opacas, rugosas, regulares y con elevación volcánica. Se hizo una siembra por estría de una colonia confirmada como *Pichia membranaefaciens* procedente de una siembra en el medio YM de la dilución de cepa pura  $10^{-4}$  ufc/mL, obteniendo un crecimiento del mismo tipo de colonias, pero más pequeñas. Se realizó otra siembra por estría de una colonia confirmada procedente de una placa de PCA (la cual, como era una siembra de aislamiento, fue sembrada con una colonia del medio de Brett sembrado con vino), donde se obtuvo el mismo crecimiento que en la siembra de estría anterior. En el caso de la siembra por estría de una colonia confirmada procedente de MGYP sembrada con vino, se obtuvo un ligero crecimiento en las primeras estrías de la placa. Respecto a las siembras con las tres muestras de vino sembradas en superficie (excepto la concentrada sembrada por estrías), se obtuvo un crecimiento, no tan fuerte como en el caso de las diluciones, en el que se desarrollaron los dos tipos de colonias blancas, las de un tipo eran rugosas, opacas, centralizadas, con ligera elevación volcánica y regulares. El otro tipo eran lisas, translúcidas, centralizadas, de ligera elevación circular y regulares. En este medio, nuestro microorganismo de interés, fue capaz de desarrollarse, pero se descartó debido a que fue utilizado como confirmación de la prueba bioquímica LDC, y no como otro medio de cultivo más de estudio.

Para las pruebas bioquímicas realizadas mencionadas anteriormente, se eligieron las colonias confirmadas de los medios YM, LM, PCA, SDA, Brett, YDP y MGYP (Figura 8). Esta selección es debida a que fue donde el crecimiento y apariencia de *P. membranaefaciens* eran adecuados para su confirmación bioquímica. Se detallarán y compararán los resultados de las diluciones de la cepa pura y de la cepa presente en las muestras de vino, tomadas de la superficie del vino y de la profundidad de la botella, esta última concentrada mediante una centrifugación (Tabla 1).



**Figura 8:** Esquema del proceso de pruebas bioquímicas.

**YM:** agar extracto de levadura y malta; **LM:** agar levadura-malta; **PCA:** agar plate count; **SDA:** agar sabouraud; **Brett:** *Brettanomyces*; **YPD:** agar extracto de levadura peptona dextrosa; **MGYP:** agar extracto de malta extracto de levadura glucosa peptona con cobre; **AL:** agar lisina; **LDC:** lisina descarboxilasa.

En relación a la prueba bioquímica de la catalasa, se realizó a varias colonias. Para una colonia confirmada de *Pichia*, procedente de una placa de PCA sembrada con el Sniff positivo de una muestra de vino, se produjo la aparición de burbujas de muy poca intensidad. Se realizó la prueba a una colonia confirmada del agar PCA, sembrada para su aislamiento con una colonia confirmada del agar Brett (sembrado con vino). En este caso se obtuvo una aparición intensa de burbujas sobre la colonia. Se realizó esta prueba en diferentes colonias a modo de comparación entre cepa pura y cepa del vino, según el medio de crecimiento: se realizó la prueba a una colonia de la cepa pura y otra del vino, ambas confirmadas y provenientes del agar YM, originando la aparición de burbujas en una intensidad moderada, pero en ambas colonias por igual. Después se hizo la prueba a una colonia de la cepa pura y del vino, confirmadas y procedentes del agar Brett. Con esta selección de colonias se obtuvo

mayor cantidad de burbujas que en el caso anteriormente mencionado de las colonias de YM, aunque sin diferencias de cantidad entre la cepa pura y la del vino.

**Tabla 1: Resultados de medios en óptimos / no óptimos, y pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa y LDC con agar AL.**

Medio	Óptimo / No óptimo		Prueba Catalasa		Prueba Oxidasa		Prueba Lisina AL	
	C.Pura	C. Vino	C.Pura	C. Vino	C.Pura	C. Vino	C.Pura	C. Vino
DRBC	✓	X	—	—	—	—	—	—
YM	✓	X	~	~	X	X	✓	✓
LM	✓	~	✓	~	X	X	✓	✓
LM inh	X	X	—	—	—	—	—	—
Sniff	✓	✓	—	—	—	—	—	—
PCA	✓	~	—	~	X	X	—	✓
SDA	✓	~	—	—	X	X	✓	✓
Brett	~	~	✓	✓	X	X	✓	✓
YPD	✓	✓	✓	✓	X	X	✓	✓
MGYP	✓✓	✓✓	✓	✓✓	✓	✓	✓	✓✓
AL	✓	✓	—	—	—	—	—	—

Significados de los símbolos: (✓✓) Muy positivo, (✓) Positivo, (~) Regular, (X) Negativo, (—) No realizado.

C. Pura: cepa pura; C. Vino: cepa del vino. DRBC: agar dicloran rosa bengala cloranfenicol; YM: agar extracto de levadura y malta; LM: agar levadura-malta; LM inh: agar levadura-malta con inhibidores; Sniff: Sniff Brett; PCA: agar plate count; SDA: agar sabouraud; Brett: *Brettanomyces*; YPD: agar extracto de levadura peptona dextrosa; MGYP: agar extracto de malta extracto de levadura glucosa peptona con cobre; AL: agar lisina; LDC: lisina descarboxilasa.

En el caso de una colonia de la cepa pura y otra del vino, procedentes del medio YPD, se obtuvo mayor cantidad e intensidad considerable de burbujas en el caso de la colonia de cepa pura que, en el caso de la colonia del vino, donde la cantidad fue algo menor con una

intensidad media-baja, pero aun así se produjo más gases que en los medios anteriores. Respecto a las colonias de cepa pura y cepa del vino procedentes del medio LM, obtenemos los mismos resultados que en el caso anterior, pero con una intensidad ligeramente menor. Por último, se realizó esta comparación entre una colonia de la cepa pura y una colonia del vino, sembradas en placas de MGYP, obteniendo para ambas colonias una intensidad muy elevada de producción de burbujas, siendo esta el resultado más elevado. Según los resultados que se obtuvieron para las diferentes colonias, se consideró que esta levadura presenta la enzima catalasa.

Respecto la prueba de la oxidasa, se realizó sobre las mismas colonias que la prueba de la catalasa, es decir, sobre el Sniff positivo con vino, una colonia del medio PCA (sembrada con una colonia de Brett) y colonias, de la cepa pura y del vino, de los medios YM, Brett, YPD, LM y MGYP. Los resultados para dicha prueba fueron negativos en todos los casos, a excepción del medio MGYP, en el cual tanto para la colonia pura como la colonia del vino se produjo un viraje instantáneo al color morado. Con dichos resultados, se concluye que nuestro microorganismo de interés, normalmente, no posee la enzima citocromo C oxidasa debido a su metabolismo principalmente fermentativo, a excepción del positivo, el cual se produjo a causa de que también puede presentar capacidad oxidativa, pero es una oxidación aeróbica incompleta.

Para la prueba bioquímica de la descarboxilación de la lisina o LDC primero se decidió realizarla con la galería API 20C Aux, escogiendo colonias confirmadas de la cepa pura, proveniente de SDA y otra de MGYP, para las que se obtuvo un resultado positivo para la colonia procedente del medio SDA (dilución  $10^{-5}$  ufc/mL), pero negativo para la colonia de MGYP (dilución  $10^{-6}$  ufc/mL). En el caso de las colonias del vino, tanto de superficie como de profundidad, procedieron de los medios SDA, LM, Brett y MGYP, obteniendo resultados dispares, ya que para las colonias procedentes del medio SDA y MGYP se obtuvo un resultado positivo, mientras que para las procedentes de LM y Brett fue negativo. Debido a estos resultados tan diversos se decidió volver a realizar esta prueba, pero esta vez no con una prueba API 20C Aux, si no con el medio AL. Se sembró por estría una colonia de cepa pura procedente del medio YM y se realizó una siembra en superficie de 0,1 mL de las diluciones de cepa pura  $10^{-1}$  y  $10^{-6}$  ufc/mL. Respecto a las muestras de vino, tanto de superficie como de profundidad, se realizó una siembra por estría de una colonia del medio PCA, MGYP y, directa de las muestras de vino concentradas por centrifugación. Se realizó la siembra de arrastre en superficie de 1 mL de muestra de vino. En este caso los resultados fueron más concordantes ya que en todas las siembras, tanto de la cepa pura como del vino, hubo crecimiento correspondiente a *Pichia membranaefaciens*. La única variación fue la

cantidad y tamaño de las colonias, siendo más grandes en las siembras del vino, pero más numerosas en las siembras de la cepa pura. Con los resultados de esta prueba que se obtuvieron del agar, se comprobó que dicha levadura presenta la enzima lisina descarboxilasa, capaz de metabolizar la lisina como única fuente de nitrógeno.

Para realizar las cuatro siguientes pruebas bioquímicas ( $H_2S$ , urea, indol y glucosa) se empleó la prueba rápida API 20C Aux y las siguientes colonias: de la cepa pura se realizaron de colonias de las diluciones  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  ufc/mL procedentes de los medios SDA y MGYB respectivamente y, en el caso de las colonias, de superficie y de profundidad, del vino se recogieron de los medios SDA, LM, Brett y MGYB (Tabla 2).



**Figura 9: Ejemplo de resultados de la prueba API 20C Aux.**

Respecto a la prueba de la sulfito reductasa o  $H_2S$ , los resultados obtenidos fueron similares para todas las colonias sobre las que se realizó la prueba, obteniendo en todos los casos un resultado negativo. Con este resultado se comprobó que, la levadura de estudio, no presenta actividad de la enzima sulfito reductasa.

En la prueba de la urea no hubo diferencias entre las colonias, ya que todas, tanto de la cepa pura como de la cepa procedente del vino, dieron como resultado negativo. Así se confirmó la ausencia de la enzima ureasa en dicha levadura.

En el caso de la prueba del indol, los resultados fueron más dispares que en los dos casos anteriores ya que, las colonias de vino procedentes de los medios LM y Brett, y la colonia de cepa pura procedente de la dilución  $10^{-6}$  ufc/mL, dieron negativo a diferencia del resto de muestras con las que se obtuvo un resultado positivo. Tras una exhaustiva revisión y comprobación de resultados, se concluyó que esta levadura si era capaz de metabolizar el

indol y los resultados negativos obtenidos, fueron causa de la pérdida de actividad y capacidad de desarrollo, debido a los pases de aislamiento de las colonias empleadas.

**Tabla 2: Resultados de medios y pruebas bioquímicas realizadas con API 20C Aux.**

Medio	Pruebas bioquímicas API 20C aux									
	LDC		H <sub>2</sub> S		Urea		Indol		Glucosa	
	C. Pura	C. Vino	C. Pura	C. Vino	C. Pura	C. Vino	C. Pura	C. Vino	C. Pura	C. Vino
DRBC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
YM	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LM	—	X	—	X	—	X	—	X	—	✓
LM inh	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sniff	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PCA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SDA	X	✓	X	X	X	X	✓	✓	✓	✓
Brett	—	X	—	X	—	X	—	✓	—	✓
YPD	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MGYP	X	✓	X	X	X	X	X	✓	✓	✓
AL	✓	✓	—	—	—	—	—	—	—	—

Significados de los símbolos: (✓) Positivo, (X) Negativo, (—) No realizado.

C. Pura: cepa pura; C. Vino: cepa del vino; DRBC: agar dicloran rosa bengala cloranfenicol; YM: agar extracto de levadura y malta; LM: agar levadura-malta; LM inh: agar levadura-malta con inhibidores; Sniff: Sniff Brett PCA: agar plate count; SDA: agar sabouraud; Brett: *Brettanomyces*; YPD: agar extracto de levadura peptona dextrosa; MGYP: agar extracto de malta extracto de levadura glucosa peptona con cobre; AL: agar lisina. LDC lisina descarboxilasa.

En relación a la prueba de la glucosa (o ácido-glucosa o β-glucosidasa), en todas las muestras de las colonias, tanto del vino como procedentes de la cepa pura, se obtuvo un resultado

común, el cual fue positivo. Con estos resultados se confirmó que la levadura *P. membranaefaciens* presenta la enzima  $\beta$ -glucosidasa.

Por último, respecto a la prueba de la secuenciación genómica, se envió al CIBIR una colonia característica. Esta colonia era procedente del medio más óptimo, confirmada al microscopio y mediante pruebas bioquímicas, correspondiente a *Pichia membranaefaciens*. Se realizó esta prueba para obtener una confirmación, con mayor grado de confianza, respecto a la identificación de las colonias y la idoneidad de los medios de cultivo. Se obtuvo un resultado positivo, confirmando la presencia de *Pichia* en el agar MGYP, el cual era el más óptimo, y consiguientemente obteniendo su confirmación en el vino.

### **3.4. Conclusiones.**

Respecto a la observación macroscópica de las colonias, se concluyó la presencia positiva de dos cepas distintas de *Pichia membranaefaciens* en el vino. El primer tipo fue de colonias blancas, rugosas, opacas, centralizadas, con cierta elevación volcánica y regulares. El segundo tipo de estas colonias fueron blancas, translúcidas, lisas, superficie con elevación redonda y de bordes regulares (alguna excepción de irregulares). En el caso de la observación microscópica de las colonias obtenidas mediante la siembra con vino, se obtuvo un resultado positivo, ya que se observaron las dos cepas de dicha levadura. Concluyendo así la presencia positiva del microorganismo causante de los defectos de malos olores, aparición de turbidez y sabores no aceptados.

Finalmente, se concluye que el medio más óptimo de los estudiados para la identificación de *Pichia membranaefaciens*, es el agar MGYP. Las razones principales de la elección de este medio fueron varias. La obtención de muy buenos resultados, tanto de la cepa pura como del vino, observándose colonias características bien diferenciadas, en cantidad y tamaño aceptables, en las cuales se podían observar correctamente las características propias de las colonias de esta levadura. Además, en este medio se produjo el crecimiento de ambos tipos de cepas de *Pichia* en las muestras de vino, y de forma considerablemente rápida sin una invasión muy intensa de la placa por mohos ni por bacterias. De esta forma se podía realizar una buena observación de las colonias de interés, las cuales no tuvieron necesidades muy elevadas de realizar una competición por los nutrientes con otros microorganismos presentes en el vino.

#### 4. Referencias bibliográficas.

- 1) Rankine B.C. *Pichia membranaefaciens*, a yeast causing film formation and off-flavor in table wine. ASEV [Internet]. 1966 [citado 12 may 2021]; 17 (2): 82-86. Disponible en: <https://www.ajevonline.org/content/17/2/82.short>
- 2) Ocón Sáenz M.E. Diversidad de levaduras no-*Saccharomyces* en diferentes ecosistemas vitivinícolas. ULR [Internet]. 2015 [citado 12 may 2021]; 159. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=44162>
- 3) Carrillo L. Levaduras. En: Universidad nacional de Salta. Hongos de los alimentos y forrajes. Carrillo L. Argentina: 2003. p. 91-97.
- 4) Zoecklein B.W., Fugelsang K.C., Gump B.H., Nury F.S. Production wine analysis. 1ª ed. New York: Van Nostrand Reinhold International Company Limited; 1990.
- 5) Beleda I., Ruiz J., Alonso A., Marquina D., Santos A. The biology of *Pichia membranifaciens* killer toxins. Toxins - MDPI [Internet]. 2017 [citado 12 May 2021]; 112 (9): 28. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2072-6651/9/4/112>
- 6) Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout T. The yeast: a taxonomic study. 1, 5ª ed. Estados Unidos de América: Elsevier Science; 2011.
- 7) Hidalgo Togores J. Tratado de enología: tomo 2. 2ª ed. Madrid: Mundi-prensa; 2011.
- 8) Martorell Guerola P. Desarrollo y aplicación de sistemas rápidos para la detección, identificación y caracterización de levaduras alterantes de alimentos. Universidad de Valencia - CSIC. 2006: 221.
- 9) Plata C., Millán C., Mauricio J.C., Ortega J.M. Formación de acetato de etilo y acetato de isoamilo por diversas especies de levaduras enológicas. Elsevier Science [Internet]. 2003 [citado 13 May 2021]; 20 (2): 217-224. Disponible en: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002002001016?casa\\_token=z5aiLc-I2XsAAAAA:p7M3leNUrQG-FFji0vK94J-I20hdVQDeT3frjZ8-B4xI1YR1Fbedq36pwmeBZ6e64hyBvnNv](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002002001016?casa_token=z5aiLc-I2XsAAAAA:p7M3leNUrQG-FFji0vK94J-I20hdVQDeT3frjZ8-B4xI1YR1Fbedq36pwmeBZ6e64hyBvnNv)
- 10) UNE-EN ISO 11133:2014 (Versión corregida en fecha 2015-02-04) Microbiología de los alimentos para consumo humano, alimentación animal y agua. Preparación, producción, conservación y ensayos de rendimiento de los medios de cultivo. (ISO 11133:2014). Normalización española (UNE), (1 noviembre 2014).
- 11) UNE-EN ISO 7218:2008. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico. (ISO 7218:2007). Normalización española (UNE), (20 Febrero 2008).
- 12) Acreditación nº 812/LE1607. Entidad Nacional de Acreditación, nº 812, (20 de Noviembre de 2020).

- 13) ISO 17025: 2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Normalización española (UNE), (20 Diciembre 2017).
- 14) Ying W., Yan-cun Z., Lin-lin F., Xiu-dong X., Ya-hui L., Jian-zhong Z. Identification and characterization of *Pichia membranifaciens* Hmp-1 isolated from spoilage blackberry wine. Journal of Integrative Agriculture [Internet]. 2018 [consulta el 13 de Mayo de 2021]; 17 (9): 2126-2136. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095311918620271>
- 15) Prácticas de microbiología [Internet]. Logroño: Universidad de la Rioja; 2011 [consulta el 15 de Mayo de 2021]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=100835>
- 16) Pruebas bioquímicas [Internet]. México: Departamento físico-químico de la Universidad Nacional Autónoma de México; [consulta el 14 de Mayo de 2021]. Disponible en: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U3c\\_PruebasBioquimicas\\_17461.PDF](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U3c_PruebasBioquimicas_17461.PDF)
- 17) Heredia Peñafiel K.E., Chiayan Kwok E., Huachi Espin L.E. Aislamiento e identificación de las taxa de levaduras presentes en el fruto de taxo (*Passiflora mollissima*), con capacidad fermentativa y resistencia alcohólica [Internet]. 2015 [citado el 14 de Mayo de 2021]; 35-78. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9052/1/UPS-QT06733.pdf>
- 18) Franco Bodek D., Castillo Blum S.E. Ferredoxinas. Educación química [Internet]. 2013 [citado 15 mayo de 2021]; 24 (4): 426-430. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0187893X13724972>
- 19) Viana Garrido F. Levaduras no-*Saccharomyces* para modular el aroma secundario de los vinos: incremento del acetato de 2-feniletilo mediante cultivos iniciadores mixtos. Universidad Politécnica de Valencia - CSIC [Internet]. 2011 [citado el 15 de mayo de 2021]; 22-162. Disponible en: <https://riUNET.upv.es/bitstream/handle/10251/12891/tesisUPV3671.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- 20) Regodón Mateos JA. Obtención y caracterización de cepas autóctonas de levaduras para la elaboración estandarizada de vinos de calidad. Universidad de Extremadura [Internet]. 1997 [citado el 15 de Mayo de 2021]; 13-99. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=212>
- 21) Fernández Olmos A., García de la Fuente C., Sáez Nieto JA., Valdezate Ramos S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Seimc [Internet]. 2010 [Consulta el 16 de Mayo de 2021]; 52. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>