

XLIV JORNADAS DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA TIERRA DE BARROS

IV Congreso Agroalimentario de Extremadura

CENTRO UNIVERSITARIO SANTA ANA ALMENDRALEJO



Del 3 al 6 de Mayo 2022

XLIV JORNADAS DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA
DE LA TIERRA DE BARROS
IV CONGRESO AGROALIMENTARIO DE EXTREMADURA

Edita:

Centro Universitario Santa Ana
C/ IX Marqués de la Encomienda, nº 2
Almendralejo
Tel. 924 661 689
<http://www.univsantana.com>

Colabora: Cajalmendralejo

Ilustración de portada:

© ALBERTO CATILLO

Diseño original:

Tecnigraf S.A.

Maquetación: Virginia Pedrero

ISBN: 978-84-7930-112-0

D.L.:

Imprime: Impresal

Ácaros en bodegas de vino fino: diversidad, microbiota asociada e impacto

CARBONERO-PACHECO, J.

MORENO-GARCÍA, J.

GARCÍA-MARTÍNEZ, T.

MORENO, J.

MAURICIO, J.C.

Departamento de Química Agrícola, Edafología y Microbiología. Universidad de Córdoba. Córdoba, España. Dirección: Campus de Rabanales, Edificio C6, 14071 Córdoba, España.

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado la presencia de ácaros en bodegas de vino fino y su relación con el velo de flor. Se ha realizado un muestreo en diversos ambientes, centrándonos en las botas con crianza biológica, pero abarcando también tinajas con vino joven y botas de solera con crianza oxidativa. Se han encontrado dos especies en este entorno, una ya descrita, *Carpoglyphus lactis* y una nueva, *Tyrophagus putrescentiae*, siendo la primera mucho más abundante. Se observó una alta densidad de *C. lactis* cerca de los velos de flor, por lo que suponemos que la presencia de este ácaro en bodega es debido al consumo de este biofilm, mientras que *T. putrescentiae* presenta baja densidad y su presencia parece ocasional.

Se ha aislado una diversidad de levaduras no-*Saccharomyces* y bacterias no observada antes en bodega en ambos ácaros, destacando la encontrada en botas de crianza biológica, estas levaduras, representadas principalmente por el género *Candida*, no parecen tener influencia en el vino, pero podrían tener utilidad en fermentaciones y en otras aplicaciones biotecnológicas.

ABSTRACT

In this work the presence of mites in fino wine cellars and their relationship with lor yeast has been studied. Sampling in various environments has been carried out, focusing in biological aging barrels, but also including clay jars with young wine and oxidative aging solera barrels. Two species have been found, *Carpoglyphus lactis*, already described, and *Tyrophagus putrescentiae*, firstly reported in fino wine cellar in this work, being the first one much more abundant. High number of *C. lactis* has been observed near flor yeast so its assumed that their presence in fino wine cellar is due biofilm consumption, while *T. putrescentiae* presents low density and its presence seems casual.

Non-*Saccharomyces* and bacterial diversity not previously observed in fino wine cellars has been isolated from both mites, highlighting the one found in biological aging barrels. The yeasts, mainly from the *Candida* genus seems to not having influence in wine but could be useful in fermentations or other biotechnological applications.

Palabras clave: Ácaros, Velo de flor, Levaduras, Bodega.

INTRODUCCIÓN

El fino es un vino elaborado en el sur de España, principalmente en las denominaciones de origen (D.O.P.) de Jerez, Montilla-Moriles y el Condado de Huelva. Se elabora mediante un método tradicional denominado sistema de “criaderas y solera”, que involucra un envejecimiento en barril de roble y la acción de cepas específicas de *Saccharomyces cerevisiae*, formadoras de velo de flor en un proceso denominado crianza biológica (Carbonero-Pacheco et al., 2022). El sistema de criaderas y solera consiste en numerosas filas de barriles de roble, denominadas botas, de aproximadamente 600 L agrupados uno encima de otros, siendo la fila situada en la base (solera) la que contiene el vino con mayor crianza, y enumerándose las su-

cesivas filas como primera, segunda, tercera etc... criaderas. Cuando parte del vino contenido en la solera es extraído para ser comercializado, en un proceso denominado "saca", el volumen retirado es repuesto con vino de la siguiente fila (en este caso primera criadera) y así sucesivamente. Esto se denomina "rocío" y no solo sirve para mantener el volumen de los barriles constante y homogeneizar el vino de distintos años dentro una misma fila, sino que aporta nutrientes que son indispensables para el crecimiento de las levaduras que forman el velo de flor (Ruiz-Muñoz et al., 2020).

Antes de entrar en este sistema dinámico, el vino ya fermentado se almacena en grandes tinajas de barro, en las que las levaduras formadoras de velo empiezan a realizar la crianza biológica, caracterizada por la formación de un biofilm en la superficie del vino que, mediante oxidación, consumen alcohol, glicerol y acidez volátil como fuente de carbono, generando a su vez, otros compuestos como el acetaldehído (Moreno et al., 2013).

A grandes rasgos, se puede afirmar que el carácter y personalidad del vino fino está claramente marcado por la crianza biológica, no obstante, otros factores tienen una importancia clave en la calidad del producto, como la madera de la bota (Valcárcel-Muñoz et al., 2022).

Sensorialmente, es un vino con notas a manzana ácida, procedentes del acetaldehído, compuesto que diferencia al fino de otros vinos con crianza oxidativa (Zea et al., 2001), además, la levadura de flor aumenta el contenido en alcoholes superiores, acetatos y etil ésteres (Moreno et al., 2005). Un fenómeno que se observa en la D.O.P. Montilla-Moriles es la presencia de ácaros en los tapones de las botas, fenómeno apreciado por los bodegueros ya que dichas botas presentan un carácter floral y cítrico, relacionado con una mayor calidad del vino contenido, sabor refrescante y olor a limón. Marín y colaboradores en 2009, identificaron al ácaro responsable como *Carpoglyphus lactis* y el carácter floral y cítrico a los compuestos citronelol y neral respectivamente, siendo este último, excretado por el ácaro en forma de feromona (Marín et al., 2009).

La presencia de *C. lactis* en botas de vino fino parece beneficiosa, pero en otros ambientes, este ácaro es un problema de contaminación debido a los microorganismos que porta y supone grandes pérdidas en productos almacenados, teniendo predilección por sustratos con alta concentración de azúcares, tales como fruta desecada, miel o productos lácteos (Hubert et al., 2015).

Se desconoce la alimentación de este artrópodo en bodega. Se ha descrito que vive en los tapones de las botas y que durante las sacas y rocíos, estos ácaros caen al vino, momento en el que aportarían los compuestos que producen (Marín et al., 2009).

La finalidad de este trabajo es conocer mejor la relación entre un ambiente extremo como son las bodegas de vino fino y los ácaros y la microbiota asociada a estos animales.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la figura 1 se muestra un esquema del diseño experimental llevado a cabo en este estudio.

Muestreo en bodega

Se realizó un muestreo en diferentes ambientes de la bodega, abarcando las tinajas donde comienza la crianza biológica, botas de vino fino de diferentes escalas del sistema de criaderas y solera (crianza biológica) y botas de crianza oxidativa. Se buscó indicios de la presencia de ácaros en las bocas de las tinajas y en los tapones de las botas. Adicionalmente y como estudio preliminar, se realizó un muestreo en los tapones y las lías (fondo de las botas) de 30 botas de crianza biológica (10 de solera, 10 de segunda criadera y 10 de cuarta) para corroborar la hipótesis de Marín y colaboradores (2009), que indica que las botas de solera, contienen mayor población de ácaros.

Se examinaron un total de 12 tinajas, 50 botas con crianza biológica y 20 botas con crianza oxidativa. Se tomó una muestra en tubo falcon estéril de la superficie del vino mediante el uso de una venencia o con una red metálica en el caso de velo, de todos los recipientes donde se tomaron muestras. Si el recipiente presentaba ácaros, se recogía una muestra de estos con la ayuda de un bisturí esterilizado, en un tubo eppendorf igualmente estéril.

Para la recogida de lías en el estudio preliminar, se utilizó una goma de longitud suficiente para llegar al fondo de la bota, extrayendo el contenido mediante una bomba de vacío.

Identificación de ácaros

Una vez en laboratorio, los ácaros eran estudiados mediante microscopía estereoscópica y convencional, con la finalidad de identificar las especies encontradas, mediante claves dicotómicas y características anatómicas. Paralelamente, parte de las muestras fueron enviadas al Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba, para su análisis mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).

Aislamiento e identificación de microorganismos

Las muestras de vino, velo y ácaros fueron diluidas en agua destilada estéril mediante dilución seriada, para obtener un sobrenadante con los microorganismos en suspensión. Se sembraron 100 µL de la dilución deseada en placas de agar YPD (2 % glucosa; 2 % peptona; 1 % extracto de levadura; 2 % agar), extendiendo con asas de Digralsky para la obtención de colonias aisladas. Se realizó un triplicado por cada muestra y se incubaron a 28 °C durante 72 h. Tras ello, se seleccionaron al azar 10 colonias por placa (30 por muestra), se aislaron por separado para obtener cultivos axénicos y se llevaron al servicio de proteómica del SCAI para su identificación mediante espectrometría MALDI-TOF, como se describe en Carbonero-Pacheco et al. (2022).

RESULTADOS

Muestreo en bodega

Se encontraron ácaros en 7 de las 12 tinajas examinadas, hallándose pequeños grupos en grietas de la boca del recipiente y grandes acumulaciones cerca del velo de las tinajas (**Figura 2 y 3**).

En la **Tabla 1**, se exponen los resultados del muestreo de tapones y lías en botas de diversas escalas con crianza biológica. Se tomaron muestras de 50 botas de solera, donde la presencia de ácaros fue mayor, hallándose artrópodos en 20 de las 50 botas.

En crianza oxidativa se encontraron pequeños grupos de ácaros en el tapón de 1 de las 20 botas muestreadas.

Identificación de ácaros

Los ácaros obtenidos en tinajas y en la bota de crianza oxidativa pertenecen a la especie *Carpoglyphus lactis* (**Figura 4**), mientras que en las botas de crianza biológica se encuentra *C. lactis* en 14 de las 50 botas y a *Tyrophagus putrescentiae* (**Figura 4**) en 6 de las 50. La presencia de este último es más escasa, encontrándose no sólo en menos botas, sino menor número de individuos, y siempre de manera aislada.

En las lías, los cadáveres de ácaro encontrados corresponden a la especie *C. lactis* (**Figura 5**).

Aislamiento e identificación de microorganismos

En las muestras de tinaja se obtuvieron resultados muy homogéneos entre muestras, aislando de los velos las levaduras *Candida guilliermondii* y *Saccharomyces cerevisiae*, y las bacterias *Bacillus vallismortis* y *Roseomonas mucosa*. De los ácaros *C. lactis* recogidos, se identificó a la levadura *C. guilliermondii* y a las bacterias *B. safensis* y *B. vallismortis*. Los porcentajes de aislamiento se muestran en la **Tabla 2**.

En las botas de solera, el 100 % de los aislados obtenido de muestras de velo correspondieron a *S. cerevisiae*, mientras que, en los ácaros, se identificaron los siguientes microorganismos:

En *Tyrophagus putrescentiae*, las especies de levadura *C. guilliermondii* y *S. cerevisiae*.

En *C. lactis*, las especies *C. guilliermondii*, *C. membranifaciens*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus saitoi*, *Hyphopichia burtonii* y *S. cerevisiae*, además de las bacterias *B. cereus* y *Kocuria koreensis*. En la **Tabla 3** se representan los porcentajes de aislamiento de cada microorganismo.

En crianza oxidativa, no se aisló ningún microorganismo de la superficie del vino, en cambio se aislaron e identificaron *S. cerevisiae* y la bacteria *Enterococcus faecalis* de los individuos de *C. lactis* en la bota donde estaban presentes.

La presencia de microorganismos en el exoesqueleto de estos artrópodos fue confirmada mediante MEB, siendo encontrados principalmente en las patas y en la zona ventral del opistosoma (**Figura 6 y 7**).

DISCUSIÓN

La capacidad de los ácaros astigmátidos de colonizar gran diversidad de ambientes es debida a su gran adaptabilidad y plasticidad alimentaria (Hubert et al., 2021), la presencia de *C. lactis* en vino fino ya había sido confirmada (Marín et al., 2009); en cambio, este trabajo supone el primer registro de su presencia en tinajas con vino joven y en botas de crianza oxidativa, además de la primera descripción de *T. putrescentiae* en bodegas de vino fino.

En las botas de crianza biológica, la mayor parte de ácaros encontrados pertenecen a la especie *C. lactis*, que podía encontrarse formando grandes aglomeraciones en los tapones; en cambio, *T. putrescentiae* fue hallado en grupos pequeños, de pocos individuos. Este dato llama la atención ya que los ácaros astigmátidos tienen una tasa de reproducción muy elevada (Hibberson y Vogelnest, 2014), lo que indica que *C. lactis* prospera en este ambiente. *T. putrescentiae* tiene una distribución cosmopolita (Zao et al., 2016; Hubert et al., 2021), pero su escasa presencia, parece ocasional en este ambiente, y más ligada a su capacidad de alimentarse con hongos filamentosos (Smrž et al., 2016) que se encuentran en la madera de las botas y no al velo y/o levaduras.

La presencia únicamente de *C. lactis* en las muestras de lías, además de la elevada frecuencia que se ha observado en los tapones (**Tabla 1**), demuestra que este ácaro tiene una influencia en un mayor número de botas, pues habita en más nichos que en los tapones. Por las observaciones en tinaja (**Figura 3**), parece ser que los ácaros abundarían cerca del velo de flor, donde por la forma de la bota, pasan inadvertidos al ojo humano.

Los muestreos en tinaja, donde se han observado grandes grupos de *C. lactis* (**Figura 2**), indica que estos ácaros tienen una relación estrecha con este biofilm. La capacidad de este ácaro para alimentarse de microorganismos, ya ha sido descrita (Hubert et al., 2015) por lo que todo parece indicar que la razón por la que habitan en presencia de vinos con crianza biológica es alimentaria.

La presencia en botas con crianza oxidativa y, por consiguiente, sin velo de flor, es algo que no hemos podido explicar aún, pero debido a la baja frecuencia con la que se han encontrado en este ambiente, parece un fenómeno aislado.

La presencia de microorganismos asociados a los ácaros genera gran interés debido a las pérdidas económicas que acarrea en productos almacenados o por la posibilidad de contaminar con patógenos, alimentos humanos (Hubert et al., 2021). En este estudio se ha observado que la microbiota asociada, varía en función del ambiente, algo observado por otros autores con anterioridad, en este caso, creemos que los ácaros arrastran consigo los microorganismos que hay entre el lugar donde se alimentan (velo de flor) y el lugar de muestreo (tapón de bota/boca de tinaja). Debido a que la distancia en tinaja es de apenas unos centímetros, la microbiota encontrada en el velo y en los ácaros es muy similar, en cambio, como el recorrido en bota es mucho más amplio, implica la adquisición de una gran variedad de levaduras no-*Saccharomyces*, que creemos, habitan en las paredes de las botas, un ambiente con alta humedad, menor concentración de alcohol que el vino y restos orgánicos que posibilita la supervivencia de las levaduras identificadas (**Tabla 3**). La gran mayoría de levaduras observadas en MEB en el exoesqueleto de los ácaros, han sido localizadas en las patas y en la zona ventral del idiosoma, esto puede indicar que los microorganismos aislados e identificados son transportados por los ácaros.

La capacidad de afectar o alterar el velo de flor por parte de los microorganismos que han sido aislados en *C. lactis* y *T. putrescentiae*, parece baja o incluso nula, ya que, en el velo de las botas con crianza biológica, no se ha aislado ninguna no-*Saccharomyces* portada por el ácaro, por lo que su repercusión en el vino no parece que sea destacable.

En las tinajas, la presencia de *C. guilliermondii* tanto en velo como en ácaros es un fenómeno destacable, pues esta levadura, hallada en todas las muestras, no se había identificado previamente en velos de flor. Otros autores han encontrado a *Pichia membranifaciens* en el velo de vino de similares características, como el sobretablas (Ruiz-Muñoz et al., 2020) o recientemente nuestro grupo ha encontrado a *C. guilliermondii* en velo de criadera, pero tras realizar un proceso en laboratorio llamado “recrecimiento” (Carbonero-Pacheco et al., 2022). La presencia en las dos especies de ácaro encontradas y en distintos ambientes en el caso de *C. lactis* (**Tabla 2 y 3**), parece indicar que estos microorganismos tienen afinidad para ser transportados por ácaros.

La presencia en velo de tinaja de *C. guilliermondii* y de las bacterias *B. vallismortis* y *R. mucosa*, puede deberse a las propias características del recipiente, donde el velo de flor está mucho más expuesto al ambiente que en

bota. El impacto de estos microorganismos en vino fino se desconoce, pero al parecer podrían estar creciendo sobre el velo, alimentándose de los componentes extracelulares de este biofilm y por lo tanto no interaccionarían directamente con el vino (Carbonero-Pacheco et al., 2022).

La presencia de *C. lactis* en botas de crianza oxidativa, donde no hay un velo del que alimentarse requiere de un estudio con mayor profundidad, el aislamiento de *E. faecalis* en este ambiente o de *K. koreensis* en botas de crianza biológica, puede deberse a microorganismos portados por el propio ácaro, ya que han sido identificados en otros ambientes (Hubert et al., 2015).

En conclusión, los ácaros tienen una presencia mayor en bodegas de vino fino de la que se conocía, interviniendo desde el principio de la crianza biológica, debido a la actividad observada, se alimentan principalmente del velo de flor y de los restos de este. Se ha confirmado la presencia de una gran diversidad de microorganismos con los ácaros en bodega, su impacto sobre el velo y por consiguiente, en el vino, ha de estudiarse con mayor profundidad, pero estos artrópodos pueden ser un buen nicho para la obtención de levaduras no-*Saccharomyces* con potencial en fermentaciones de mostos o en otras aplicaciones biotecnológicas.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido cofinanciada por el Programa Operativo FEDER 2014-2020 y la Consejería de Economía, Conocimiento, Empresas y Universidad de la Junta de Andalucía (Referencia: 1380480-R; TG-M y JuM) y por el contrato ART. 83 OTRI con la compañía Pérez Barquero asociado al CDTI 2020 (Referencia: 12020062; JCM).

REFERENCIAS

- Carbonero-Pacheco, J., Moreno-García, J., Moreno, J., García-Martínez, T., y Mauricio, J. C.. "Revealing the Yeast Diversity of the Flor Biofilm Microbiota in Sherry Wines Through Internal Transcribed Spacer-Metabarcoding and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry". *Frontiers in Microbiology*, 12, 2022, 825756.
- Hibberson, C.E. y Vogelnest, L.J. "Storage mite contamination of commercial dry dog food in south-eastern Australia". *Australian Veterinary Journal*, 92, 2014, 219-224.
- Hubert, J., Nesvorná, M., Kopecký, J., Ságová-Marečková, M., y Poltronieri, P. "Carpoglyphus lactis (Acari: Astigmata) from various dried fruits differed in associated micro-organisms". *Journal of Applied Microbiology*, 118(2), 2015, 470-484.
- Hubert, J., Nesvorna, M., Green, S. J., y Klimov, P. B. "Microbial Communities of Stored Product Mites: Variation by Species and Population". *Microbial Ecology*, 81(2), 2021, 506-522.
- Marín, J., Ocete, R., Pedroza, M., Zalacain, A., de Miguel, C., López, M. A., y Salinas, M. R. "Influence of the mite *Carpoglyphus lactis* (L) on the aroma of pale and dry wines aged under flor yeasts". *Journal of Food Composition and Analysis*, 22 (7-8), 2009, 745-750.
- Moreno, J.A., Zea, L., Moyano, L. y Medina, M. "Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological aging". *Food Control*, 16, 2005, 333-338.
- Moreno-García, J., Raposo, R., y Moreno, J. "Biological aging status characterization of Sherry type wines using statistical and oenological criteria". *Food Research international*, 54, 2013, 285-292.
- Ruiz-Muñoz, M., Cordero-Bueso, G., Benítez-Trujillo, F., Martínez, S., Pérez, F., y Cantoral, J. M. "Rethinking about flor yeast diversity and its dynamic in the "criaderas and soleras" biological aging system". *Food Microbiology*, 92, 2020, 103553.
- Smrž, J., Soukalová, H., Čatská, V., y Hubert, J. "Feeding Patterns of *Tyrophagus putrescentiae* (Sarcoptiformes: Acaridae) Indicate That Mycophagy Is Not a Single and Homogeneous Category of Nutritional Biology". *Journal of Insect Science*, 16(1), 2016, 1-8.

Valcárcel-Muñoz, M. J., Guerrero-Chanivet, M., Rodríguez-Dodero, M. D. C., García-Moreno, M. de V., y Guillén-Sánchez, D. A. "Analytical and Chemometric Characterization of Fino and Amontillado Sherries during Aging in System". *Molecules*, 27(2), 2022, 1-25.

Zhao, Y., Abbar, S., Amoah, B., Phillips, T.W. y Schilling, M.W. "Controlling pests in dry-cured ham: a review". *Meat Science*, 111, 2016, 183-191.

Zea, L., Moyano, L., Moreno, J., Cortes, B. y Medina, M. "Discrimination of the aroma fraction of Sherry wines obtained by oxidative and biological aging". *Food Chemistry*, 75, 2001, 79-84.

FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Esquema de trabajo y tratamiento de las muestras recogidas.

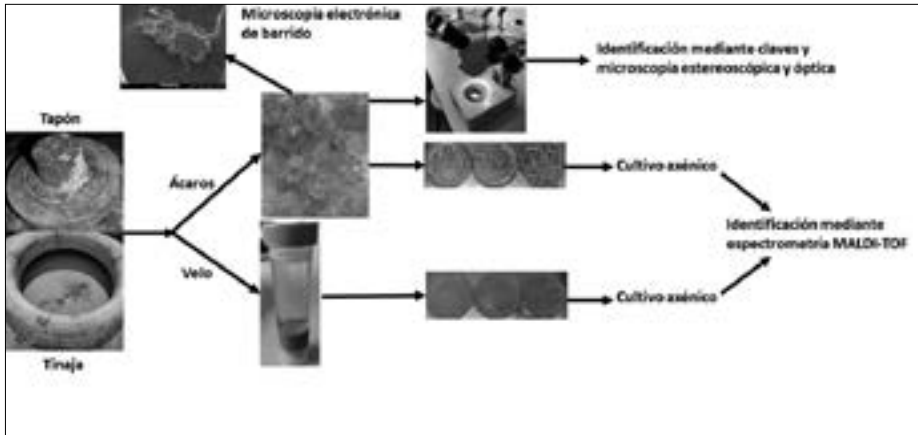


Figura 2. Presencia de ácaros en la boca de tinajas con vino joven. Los artrópodos tienen tendencia a agregarse en las grietas que presentan estos recipientes.



Figura 3. Acumulación de ácaros alrededor del velo de flor en tinaja.

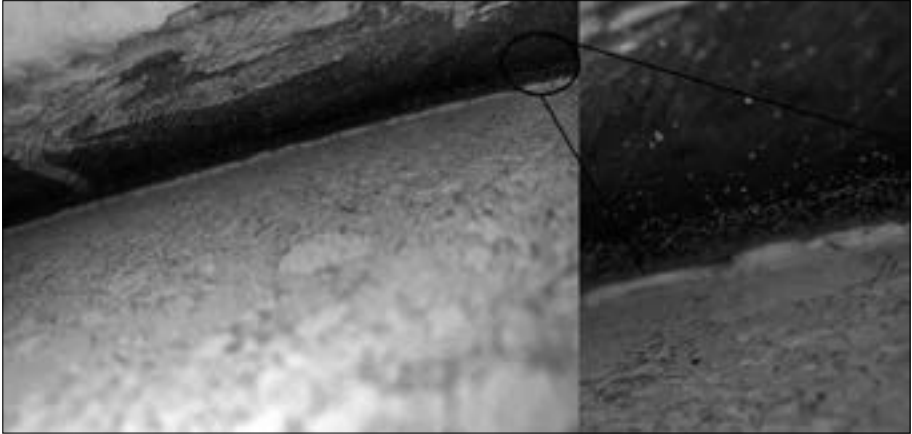


Figura 4. Ejemplares de *C. lactis* (Izquierda) y *T. putrescentiae* (Derecha) bajo el objetivo X10 del microscopio óptico.

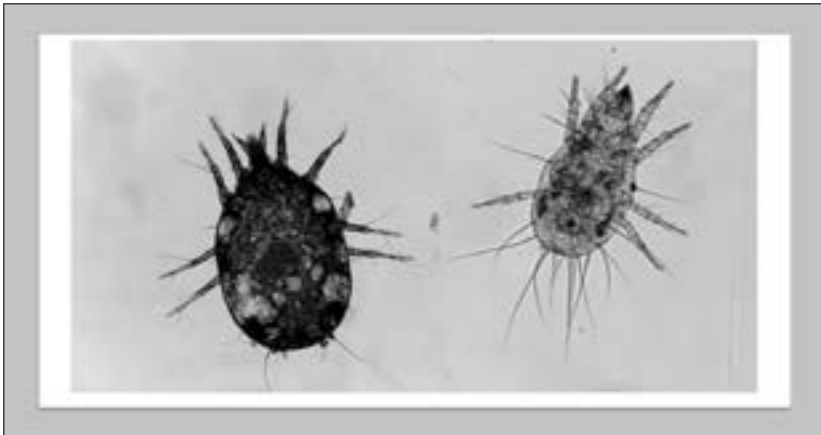


Figura 5. Cadáveres de *C. lactis* en lías de botas de crianza biológica, observados en el microscopio estereoscópico.

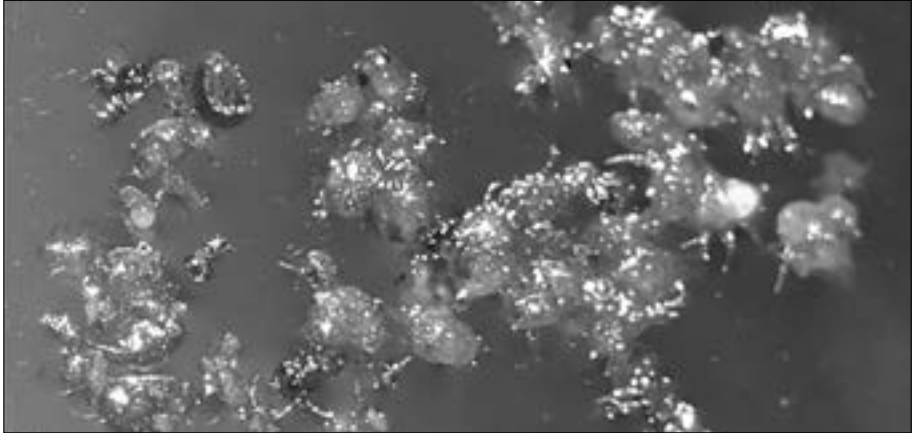


Figura 6. Ejemplar de *C. lactis* visto en MEB.

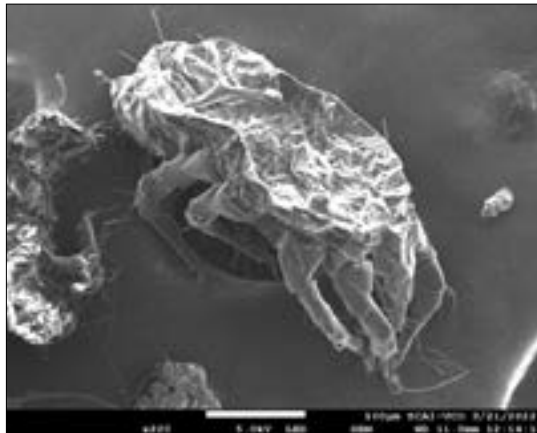


Figura 7. Diferentes microorganismos (destacados en círculos rojos) sobre el exoesqueleto de ácaros observados en MEB.

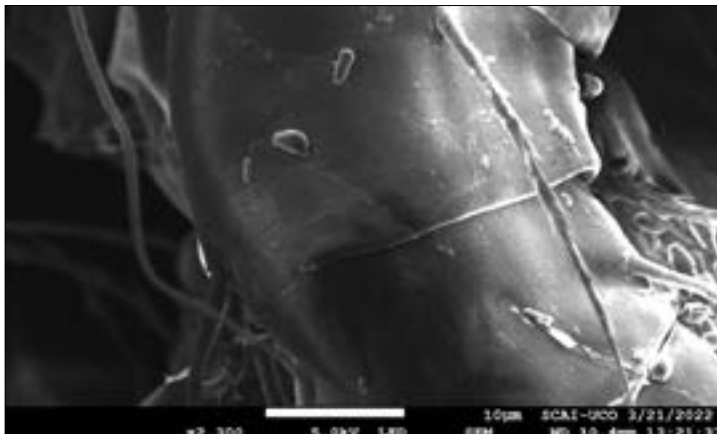


Tabla 1. Porcentaje de ácaros encontrados en las diferentes escalas muestreadas. La presencia en tapón corresponde a ácaros vivos y la presencia en lías a cadáveres.

Escala	Presencia en tapón (%)	Presencia en lías (%)
Cuarta criadera	0	10
Segunda criadera	0	20
Solera	20	80

Tabla 2. Presencia (%) de las especies identificadas en el total de las muestras de velo o ácaros de tinaja (- : especie no presente).

Especie	Presencia en velo (%)	Presencia en ácaro (%)
<i>Candida guilliermondii</i>	100	100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100	-
<i>Roseomonas mucosa</i>	50	-
<i>Bacillus vallismortis</i>	100	100
<i>Bacillus safensis</i>	-	100

Tabla 3. Presencia (%) de las especies de microorganismos aislados, del total de 20 botas con presencia de ácaros en el tapón (- : especie no presente).

Especie	<i>Carpoglyphus lactis</i> (%)	<i>Tyrophagus putrescentiae</i> (%)
<i>Candida guilliermondii</i>	40	25
<i>Candida tropicalis</i>	15	-
<i>Candida membranifaciens</i>	5	-
<i>Cryptococcus saitoii</i>	5	-
<i>Hypopichia burtonii</i>	10	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25	5
<i>Bacillus cereus</i>	20	-