

LEVADURAS AISLADAS DE MOSTOS DE UVA EN LA ZONA DE "OLTREPO PAVESE" (ITALIA) Y SU SENSIBILIDAD IN VITRO FRENTE A COMPUESTOS DE COBRE Y ZINC

Mangiarotti Anna Maria & Picco Anna Maria

Istituto di Micologia Medica "R Ciferri & P. Redaelli"
Università di Pavia (Italia)

Palabras clave: Sensibilidad de compuestos Cobre y Zinc, *Saccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, mostos.

Key words: Sensibility to Zinc and Copper compounds, *Saccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, musts.

RESUMEN

Se investigó durante el período 1989-90 en la región de Oltrepó Pavese (Italia), la micota de los mostos provenientes de uvas negras y blancas. De un total de 28 especies levaduriformes aisladas, incluidas en 10 géneros, *Saccharomyces*, fué el género dominante con las especies *S. italicus* y *S. cerevisiae*. También se detectaron frecuentemente levaduras anascosporógenas, tales como *Candida valida*, *Torulopsis (C.) holmii* y *Kloeckera apiculata*.

Se efectuaron estudios de sensibilidad in vitro frente a compuestos de CuSO_4 y ZnSO_4 , ya sea en cepas de *S. cerevisiae* aisladas de los mostos, como de *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium* y *Sporobolomyces*, aisladas del filoplano de la uva. Las concentraciones de CuSO_4 a 0,007M y a 0,062M, fueron fungicidas para *S. cerevisiae* y *Sporobolomyces roseus* respectivamente.

INTRODUCCION

El área de las colinas de la zona de Oltrepó Pavese, está ocupada por notorias extensiones de viñedos de uva negra y blanca. Los viñedos de mayor importancia son los que originan vinos rojos (Barbera y Bonarda) y los vinos blancos (Malvasia, Moscato, Pinot blanco y Riesling).

Los datos microbiológicos relativos a la micota levaduriforme sobre las uvas y mostos de esta zona vitivinícola, son escasos y limitados. Nuestra investigación abarcó muestras de mostos de uva blanca y negra elaborados en bodegas de la zona, para determinar la composición cualitativa de levaduras autóctonas y su distribución. Al mismo tiempo, debido al tratamiento con pesticidas sistémicos en cuya formulación contienen sales de Zn y Cu, (Mangiarotti et al 1987), se evaluará la actividad in vitro de dichos metales frente a los hongos dominantes

SUMMARY

[Yeast isolated from musts of grapes in Oltrepó Pavese (Italy) and their sensibility in vitro to Zinc and Copper compounds]

The mycoflora of musts samples from white and black grapes has been investigated in Oltrepó Pavese (Italy) in the years 1989-90. Among the 28 yeast species isolated, included in 10 genera, *Saccharomyces italicus* and *S. cerevisiae* were dominant species. Anascosporogenous yeast such as *Candida valida*, *Torulopsis (C.) holmii*, and *Kloeckera apiculata* were also frequent.

Effects of CuSO_4 and ZnSO_4 on *S. cerevisiae* isolated from musts and on species of *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium* and *Sporobolomyces*, isolated from grape phylloplane were also studied in vitro.

Concentration of CuSO_4 at 0,007 M and at 0,062 M, were fungicidal to *S. cerevisiae* and *Sporobolomyces roseus* respectively.

ya sea en los mostos como en el filoplano de los viñedos.

MATERIALES Y METODO

1.-Los mostos. En el curso de la vendimia 1989-90 se investigaron 36 muestras de mostos de uvas blancas tipo, Riesling, Moscato, Malvasia y Pinot gris y los de uva negra Bonarda y Barbera, en 11 bodegas de la zona del Oltrepó Pavese.

En el mapa del área vitivinícola examinada (Fig.1), se indican las localidades en las cuales se encuentran las bodegas examinadas y su altitud.

Los aislamientos desde los diferentes mostos, se efectuaron en los mismos periodos de tiempo desde el inicio de la fermentación, en matraces estériles de 300ml., desde la parte superior de las tinajas.

La micota levaduriforme del mosto, fué obtenida mediante la técnica de diluciones seriadas (1/10, 1/100,

1/1000); 1 ml de cada dilución fué sembrado en triplicado en placas de Petri en los siguientes medios de cultivo: Agar Sabouraud, Agar Papa Dextrosa y el medio de Wickerham. Se incubaron a 25°C durante 4 días.

La identificación genérica y específica está basada en los perfiles morfológicos y bioquímicos propuestos por Kreger van Rij (1984).

2.- Pruebas de sensibilidad *in vitro*. Se efectuaron solo con 3 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Cepas IMM, 515, 523, 526) y 4 de *Sporobolomyces roseus*, (Cepas IMM, 588, 529, 600, 606) aisladas de mostos; además de 2 *Botrytis cinerea* (Cepas IMM, 466, 467), 2 *Cladosporium cladosporioides* (Cepas IMM, 472, 473) y 2 *Alternaria alternata* (Cepas IMM, 410, 411), del filoplano de los viñedos.

El test de sensibilidad *in vitro* fué realizado según la técnica propuesta por Gadd (1983).

En placas de Petri de 10 cm de diámetro con 20 ml del medio Yeast Nitrogen Base (Difco) + 12 gr de agar Oxoid en 1 litro. Se sembró 1 ml de una suspensión (10^6) de la levadura en agua estéril desde un cultivo fresco. Al centro de la placa, mediante una bomba de vacío, se practicó un orificio de 6 mm de diámetro en el que se depositó 20 μ l de una suspensión de Cu o Zn filtrados y concentrados desde :1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,062, 0,031, 0,015, 0,007M.

La placas fueron incubadas a 25°C durante 4 días para las levaduras y 7 días para los hongos filamentosos. La sensibilidad de los hongos a diferentes concentraciones de cada metal, fué realizada en triplicado y evaluada midiendo en mm los halos de inhibición del crecimiento fúngico.

RESULTADOS

1.- Hongos aislados de los mostos. En las 36 muestras se aislaron exclusivamente levaduras ya sea en su fase anamorfica o teleomorfica, solas o asociadas entre ellas en un mismo mosto, identificándose 28 especies que abarcan 10 géneros, representados en la Tabla 1 y 2.

Saccharomyces, fué el género dominante en un 70% en uvas blancas y negras, con 12 especies. De éstas *S. italicus*, fué aislado de 22 de 36 muestras de mostos; le siguen en orden decreciente de frecuencia *S. cerevisiae* (16), *S. exiguus* (11), *S. heterogenicus* (5). Otras especies ocasionales fueron *S. microelipsoides*, *S. rouxii*, *S. acetii*, *S. bayanus* y *S. fermentati*; solo una vez aislamos *S. montanus*, *S. florentinus* y *S. saitoanus*.

Metschnikowia pulcherrima, fué aislada casi exclusivamente de la localidad de Volpara y la única especie presente en los mostos Bonarda y Barbera, como así *Hansenula anomala*, de mostos rojos tipo Bonarda.

La presencia de *Pichia vini* y *Debaryomyces hansenii*, fué ocasional.

Las levaduras anamorfas fueron escasas en general y las 11 especies identificadas abarcan 4 géneros: *Candida*, *Kloeckera*, *Brettanomyces*, *Torulopsis* y *Idobutyrula*.

Torulopsis (Candida) holmii, fué aislada de blanca y negra (asociada a *Kloeckera apiculata* y *javanica*) y prevalentemente de mostos proveniente la misma localidad. *C. valida*, *C. vini* y *C. intermedia* fueron aisladas frecuentemente de las uvas blancas mientras *B. intermedius*, ocasionalmente en algunas bodegas de mostos de uvas blancas y negras, asociadas a otras levaduras.

2.- Test de sensibilidad *in vitro* de las levaduras filamentosas versus Zn y Cu. La sensibilidad de las diferentes cepas versus soluciones de Zn y Cu a diferentes concentraciones, está expresada en las tablas 3 y 4. El sulfato de cobre, es particularmente activo con *S. cerevisiae* y *Sp. roseus* (Fotografía 1 y 2), como también en los mohos *A. alternata*, *B. cinerea* y *C. cladosporium* (Fotografía 3), a las concentraciones de 1M. A concentraciones decrecientes *B. cinerea*, no se inhibió (0,5M igual que *A. alternata* (0,125M) y *C. cladosporium* (0,031M). A estas concentraciones, también algunas cepas de *Sporobolomyces* fueron sensibles. *Saccharomyces*, fué la levadura más sensible al CuSO_4 (Tabla 3).

Diferente es el comportamiento de las mismas cepas fúngicas frente al ZnSO_4 , este compuesto es inactivo frente a *Cladosporium*, *Alternaria* y *Botrytis* y general frente a las levaduras blancas y rosadas. *S. cerevisiae* es ligeramente sensible a las concentraciones de esta a 1M y *Sp. roseus* a 0,5M.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En general no se ha establecido una diferencia cuantitativa de la micota presente en los mostos de uva negra y blanca. Más aún en los mostos analizados en bodegas de pequeñas haciendas vitivinícolas, la micota fúngica es muy diversificada, como ocurre en la localidad de Marrone. Al contrario en los mostos de las grandes cooperativas, donde se procesan uvas cultivadas en diferentes localidades, la micota fúngica es poco diversificada, dominando en ella *S. italicus* y *S. cerevisiae* (Broni, S. Maria della Versa, Golferenzo), dos levaduras que son utilizadas en la fermentación dirigida. De las levaduras características de los mostos de ciertas localidades, tal como *S. bayanus* y *S. cerevisiae* (Casano Staffora), *T. (C.) holmii* y *S. italicus* (Marrone), *M. pulcherrima* (en todos los mostos de Volpara), esta última junto a *K. apiculata*, ha sido descrita, en especial en los mostos de la zona sur de Alemania (Benda 1979) en Checoslovaquia (Laho, 1970), y en Francia en las regiones del Loira (Poulard, 1979; Poulard y Sim

Tabla 1
Frecuencia de levaduras en las localidades analizadas

	Localidad											Total
	A*	B	C	D	E	F	G	H	I	L	M	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
<i>Hansenula anomala</i>	1	-	1	-	1	-	-	2	-	-	-	5
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	-	1	-	-	-	4	-	-	-	-	-	5
<i>Pichia vini</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>Saccharomyces aceti</i>	1	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>S. bayanus</i>	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>S. cerevisiae</i>	1	-	3	2	2	-	1	3	2	3	-	16
<i>S. exiguus</i>	2	3	1	1	1	-	-	1	1	1	-	11
<i>S. fermentati</i>	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	2
<i>S. florentinus</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>S. heterogenicus</i>	1	1	-	-	1	-	1	-	-	1	-	5
<i>S. italicus</i>	1	3	1	1	5	1	1	2	3	3	1	22
<i>S. microellipsoides</i>	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	3
<i>S. montanus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>S. rouxii</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-	3
<i>S. saitoanus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>Brettanomyces intermedius</i>	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	1	3
<i>Candida intermedia</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	2
<i>C. valida</i>	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	2
<i>C. vini</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
<i>Kloeckera apiculata</i>	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	3
<i>Kl. javanica</i>	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	2
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>Torulopsis (Candida) apicola</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>T. (C.) colliculosa</i>	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	3
<i>T. (C.) holmii</i>	-	-	1	-	3	-	2	-	-	-	-	6
<i>T.(C.) stellata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Total géneros	10											
Total especies	28											

Tabla 2 - Distribución de las levaduras en los 36 mostos estudiados

	Riesling	Moscato	Malvasia	Pinot	Barbera	Bonarda
Rivanazzano (A)	S. heterogenicus S. exiguus S. cerevisiae S. italicus			S. microellipsoides T.(C.) colliculosa S. acetii		G. candidum H. anomala S. exiguus
Retorbido (B)	S. exiguus S. italicus S. rouxii	S. exiguus S. heterogenicus B. intermedius S. italicus M. pulcherrima	S. exiguus			S. italicus
Casanova Staffora (C)				S. bayanus S. cerevisiae S. fermentati H. anomala	S. bayanus S. cerevisiae T.(C.) holmii S. microellipsoides	S. cerevisiae T. (C.) apicola C. intermedia S. exiguus S. italicus
Varzi (D)					S. acetii S. cerevisiae S. exiguus	S. italicus S. cerevisiae
Marrone (E)	T. (C.) holmii S. italicus S. heterogenicus	T.(C.) holmii K. javanica K. apiculata C. valida	T.(C.) holmii S. microellipsoides S. italicus T.(C.) colliculosa C. valida K. javanica	S. italicus S. cerevisiae B. intermedius	S. exiguus S. italicus	S. italicus H. anomala D. hansenii
Volpara (F)	T.(C.) colliculosa K. apiculata M. pulcherrima	S. italicus C. vini		M. pulcherrima G. candidum	M. pulcherrima	M. pulcherrima
Rovescala (G)			K. apiculata S. florentinus S. heterogenicus T.(C.) holmii			T.(C.) holmii S. italicus S. cerevisiae P. vini
Broni (H)		S. cerevisiae S. exiguus			S. cerevisiae S. italicus H. anomala S. fermentati	S. cerevisiae S. italicus H. anomala
S. Maria della Versa (I)	S. rouxii S. italicus C. intermedia				S. italicus S. cerevisiae	S. cerevisiae S. italicus
Golferenzo (L)	S. exiguus S. montanus S. cerevisiae	S. cerevisiae S. italicus			S. rouxii R. glutinis S. saitoanus S. italicus S. heterogenicus	S. cerevisiae S. italicus
Stradella (M)						T. (C.) stellata

1981; Sapis et al. 1976); estas especies junto a *S. elipsoideus*, operan en el inicio de la fermentación espontánea de los mostos en estas zonas, que presentan condiciones climáticas limitadas para el cultivo de la vid.

Nuestros aislamientos de *M. pulcherrima*, en mostos de uva blanca y negra, provenientes de los viñedos de una sola zona de Oltrepó Pavese, nos hace pensar en un origen autóctono de esta especie.

En lo que respecta a los resultados in vitro de las actividades de los compuestos de Cu y Zn, frente a las levaduras de los mostos y los hongos filamentosos del filoplano, los datos obtenidos evidencian una marcada diferencia de actividad sobre el crecimiento fúngico.

La incorporación de estos dos metales en formulaciones químicas para uso fitosanitario ha sido utilizada desde mucho tiempo debido a la toxicidad de estos iones hacia los hongos. La acción quelante del ión metálico sobre la célula fúngica involucra diferentes tipos de enzimas: el Cu inhibe las amino y sulfhidrilo dependientes, en cambio el Zn sólo las amino dependientes.

Estos 2 metales cuya toxicidad hacia el hombre y los animales no es problemática, revelan aspectos interesantes en nuestros test in vitro, debido a la diferente actividad desarrollada por estos contra los hongos. El $ZnSO_4$, es escasamente activo o inactivo ya sea contra las diferentes cepas de *S. cerevisiae* aisladas de diversos mostos de uva blanca y negra, como también en todos los filamentosos analizados del filoplano; por el contrario el $CuSO_4$, presenta una toxicidad marcada en concentraciones variables, en especial frente a *S. cerevisiae*. Los hongos filamentosos del filoplano, muestran una menor sensibilidad, en especial *B. cinerea*. Entre los metales pesados el Cu es el elemento más estudiado en su acción sobre la célula fúngica. *Aureobasidium pullulans*, *S.*

cerevisiae y *Sp. roseus*, son las especies más estudiadas por los investigadores, para valorar la actividad tóxica de estos metales (Gadd & Griffith 1980a y b; Ross, 1973a, b, 1974, 1975, 1980). Ross (1977), ha detectado en cepas de *S. cerevisiae*, resistentes al Cu a concentraciones de 75 a 100 mM/l, que esta resistencia no es estable debido quizás a su origen genético o adaptativo (Gadd, 1983).

Los compuestos cupricos más que los de zinc, se emplean aún ampliamente en viticultura, para prevenir enfermedades fúngicas de la vid producidas por epifitos, saprófitos o patógenos, presentes en frecuencia variable sobre el filoplano o los racimos, en el curso del ciclo vegetativo de la vid. *Botrytis*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Sporobolomyces* y *Saccharomyces*, son los géneros que normalmente colonizan el filoplano de la vid. Algunos de éstos pueden causar enfermedades o daños notorios, como *Botrytis*, al comprometer los racimos; otros como *Saccharomyces*, son de utilidad por cuanto constituyen el inóculo de la levadura autóctona en el proceso fermentativo del mosto. Debido a este hecho, con la maduración inicial de la uva, cada tratamiento con compuestos a base de Cu, debería suspenderse con el fin de evitar su efecto tóxico sobre las levaduras y por ende una marcada reducción de la carga fúngica útil en la fase fermentativa del mosto, en el curso de la cual *S. cerevisiae*, probablemente junto a otras levaduras desempeñan un función esencial. Sin embargo, esta situación no siempre se respeta, por el intento de prevenir la insurgencia del moho gris (*Botrytis*). La diferente distribución y selección de la micota levaduriforme encontrada por nosotros en los viñedos de las localidades estudiadas, podría estar más correlacionada al tratamiento antifúngico practicado, que a las comunidades naturales de los viñedos.

Tabla 3

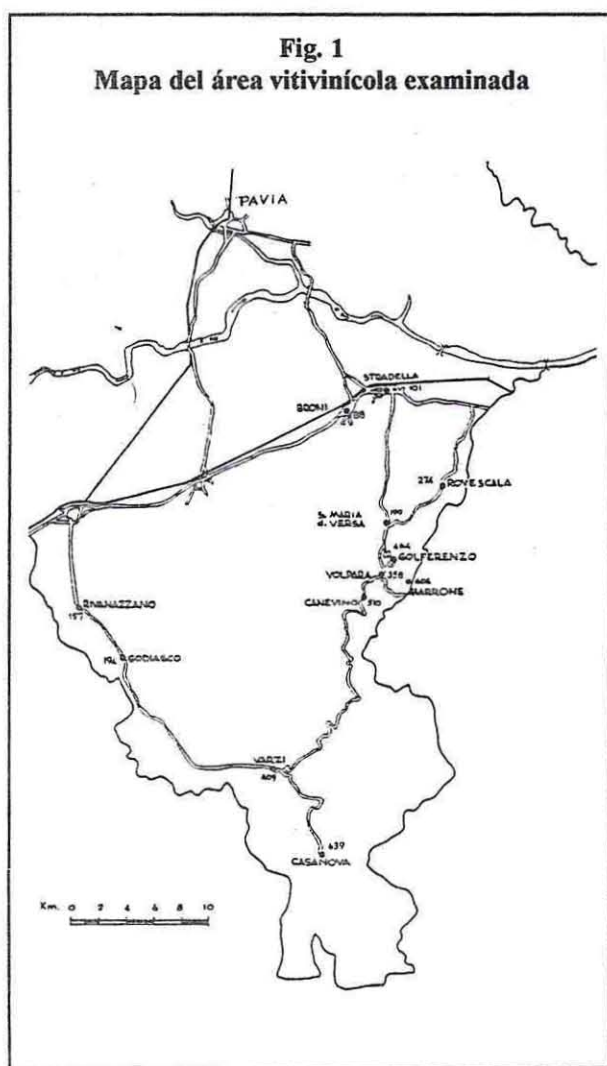
Actividad inhibitoria in vitro del sulfato de cobre sobre el crecimiento fúngico (diámetro de inhibic. en mm)

	Cepas	M o l a r i d a d							
		1	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031	0.015	0.007
<i>Alternaria alternata</i>	410	40	30	20	0	0	0	0	0
<i>Alternaria alternata</i>	411	30	20	10	0	0	0	0	0
<i>Botrytis cinerea</i>	466	40	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. cinerea</i>	467	30	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	472	60	35	30	25	20	15	0	0
<i>C. cladosporioides</i>	473	50	30	25	20	10	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	515	60	50	40	35	30	20	15	0
<i>S. cerevisiae</i>	523	60	50	45	40	35	30	25	0
<i>S. cerevisiae</i>	526	60	55	50	45	40	35	30	30
<i>Sporobolomyces roseus</i>	592	60	50	45	40	35	25	10	0
<i>S. roseus</i>	588	60	55	50	45	40	30	20	0
<i>S. roseus</i>	600	40	35	30	25	20	10	0	0
<i>S. roseus</i>	606	45	40	30	25	20	0	0	0

Tabla 4

Actividad inhibitoria in vitro del sulfato de zinc sobre el crecimiento fúngico (diámetro de inhibic. en

	Cepas	M o l a r i d a d							
		1	0.5	0.25	0.125	0.062	0.031	0.015	0.0
<i>Alternaria alternata</i>	410/411	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Botrytis cinerea</i>	466/467	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	472/473	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	515	15	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i>	523/526	10	5	0	0	0	0	0	0
<i>Sporobolomyces roseus</i>	592	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. roseus</i>	588	30	20	0	0	0	0	0	0
<i>S. roseus</i>	600	20	15	0	0	0	0	0	0
<i>S. roseus</i>	606	30	20	0	0	0	0	0	0

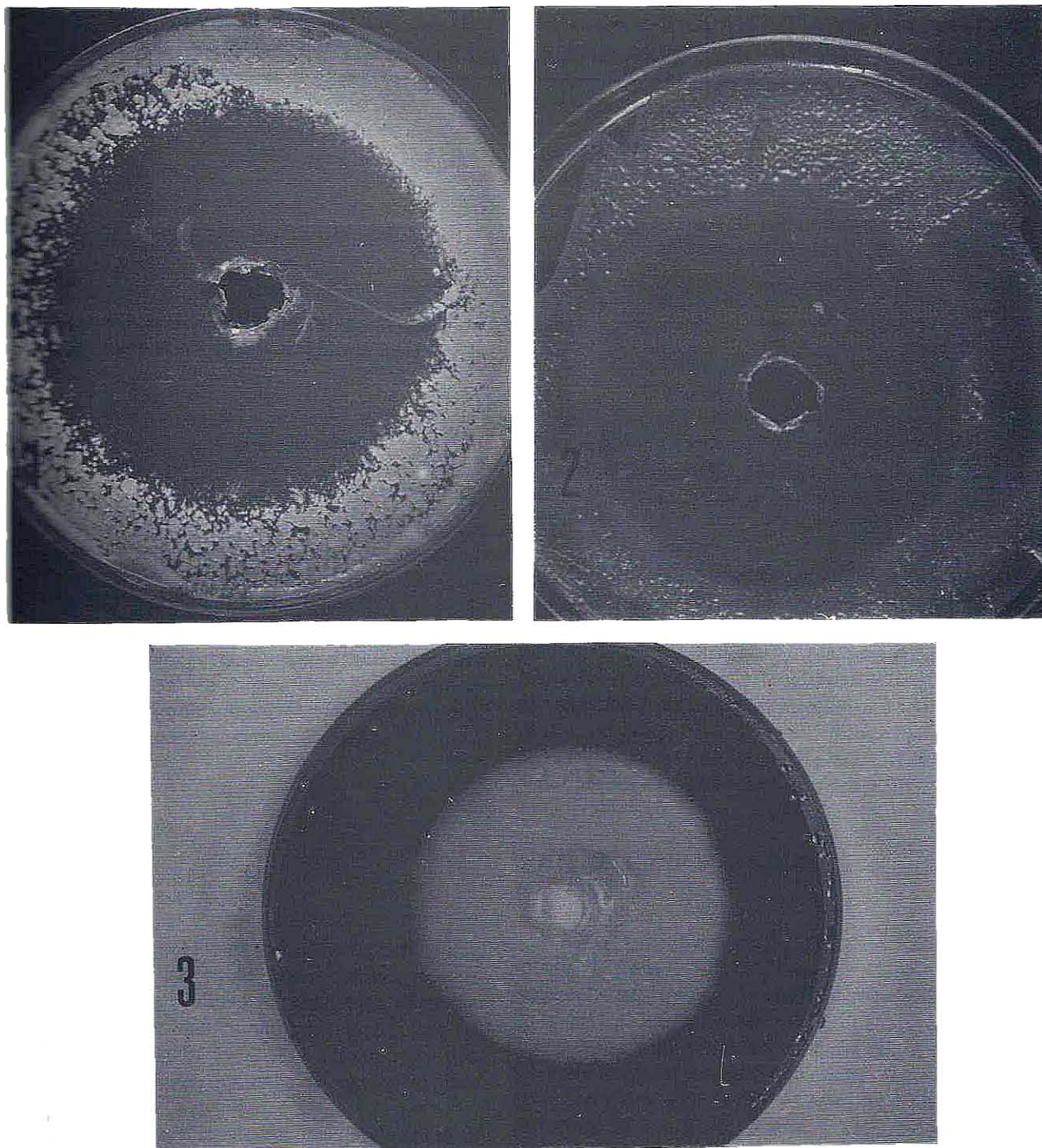


Agradecimientos

Este trabajo fué financiado por el MURST, Italia (6). Los autores agradecen a Gloria Della Volpe por asistencia técnica.

REFERENCIAS

- Benda, I. (1964). Die Hefeflora des Frankischen Weinbaudes Weinber und Keller 11 : 67-80.
- Gadd, G.M. (1983). The use of solid medium to study effects of mium, copper and zinc on yeast-like fungi: applicability limitation. *Journal of Applied Bacteriology*, 54 : 57-62.
- _____ & Griffiths, J. A., (1980). Effects of copper morphology of *Aureobasidium pullulans*. *Trans. Mycol. Soc.*, 74 : 387-392.
- _____ (1980). Influence of pH on toxicity and up take of copper in *Aureobasidium pullulans*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 75 : 91-102.
- Kreger-Van Rij, N. J. W. (1984). The yeasts, a taxonomic study Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, pp. 1082.
- Laho, L., Minarik, E., Navarro, A. (1970). Chimie, microbiologie analyse des vins. Ed. VSAV, Bratislava, p. 150.
- Lodder, J. (1952). The yeasts, a taxonomic study Amsterdam, North Holland Public. Co., pp. 1385.
- Mangiarotti, A.M., Picco, A.M., Crippa, A., Savino, E. (1987). Funghi on phylloplane of treated and not treated vineyard. *Rivista Patologia Vegetale*, S. IV, XXIII : 27-37.
- Poulard, A., (1979). Recherches sur la microflore levurienne, fermentaire et oxydative du vignoble nantais. Thèse de Doctorat d'Université, Nantes, pp. 196.
- _____ & Simon, L. (1981). La microflore levurienne du vignoble nantais. *Cryptogamie, Mycologie*, 2 : 13-25.
- Ross, I. S., Old, K. M. (1973a). Mercuric chloride resistance of *Pyrenophora avenae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 60 : 293-300.
- _____ (1973 b). Thiols, compounds and resistance of *Pyrenophora avenae* to mercury. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 60 : 301-310.
- _____ (1974). Non-protein thiols and mercury resistance of *Pyrenophora avenae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 63 : 77-82.
- _____ (1975). Some effects of heavy metals on fungal cell growth. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 64 : 175-193.
- Ross, S., (1977). Effect of glucose on copper uptake and toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 69 : 77-81.
- Sapis-Domercq, S., Guittard, A., (1976). Etude de la microflore levurienne du Roussillon. *Connaissance de la vigne et du vin* 1 : 1-21.



Fotografía 1. Actividad inhibitoria del sulfato de cobre frente a *Saccharomyces cerevisiae*, 2. Actividad inhibitoria del sulfato de cobre frente a *Sporobolomyces roseus*, 3. actividad inhibitoria del sulfato de cobre frente a *Cladosporium cladosporioides*