



Ignacio Belda

Dpto. Genética, Fisiología y Microbiología
Universidad Complutense de Madrid

Contacto:

ignaciobelda@ucm.es

minelab.bioucm.es



[@nacho_belda](https://twitter.com/nacho_belda)



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Agenda

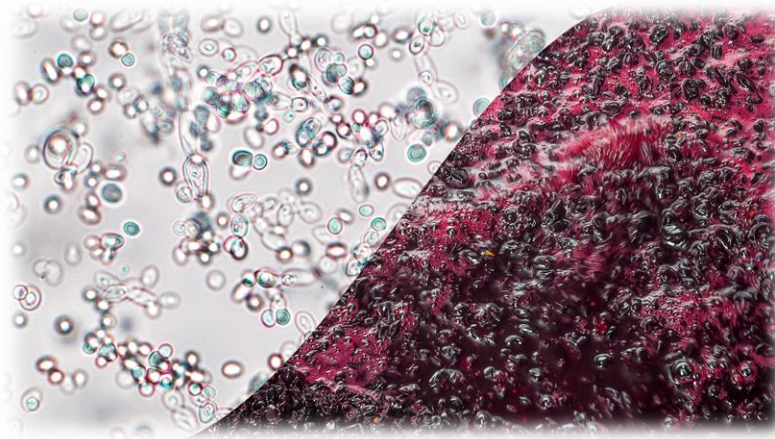
1. Ecología microbianas en viñedos

- *Patrones globales en la estructura de la microbiota en suelos de viñedos*



2. Microbiota fermentativa

- *Conexión con el viñedo, diversidad en levaduras y estrategias de fermentación*

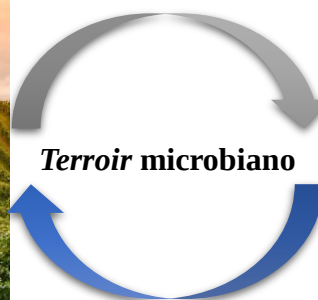


Microbiología del vino

Viñedo



Bodega



Terroir microbiano



Suelo y
Rizosfera



Madera



Hojas



Bayas



Mosto



Depósitos y
barricas



Botella

La microbiota es el hilo conductor en el proceso de elaboración de un vino

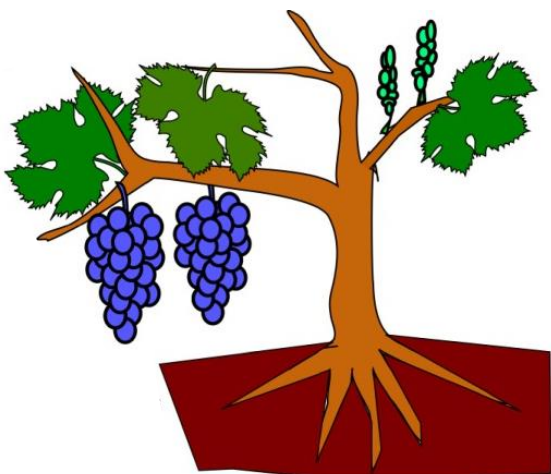
Es determinante en la salud del viñedo y el desarrollo de la fermentación... e incluso (la microbiota humana) interviene en la percepción sensorial del vino y su efecto en la salud de los consumidores

Diversidad microbiana en vitivinicultura

Enfermedades o decaimientos en vid	Nº especies
Enfermedad de Pie Negro	13
Decaimiento por <i>Botryosphaeria</i>	18
Yesca / enfermedad de Petri	40
Enfermedad de Pierce (<i>Xylella</i>)	1
Eutipiosis	11
Podredumbre por <i>Armillaria</i>	3
Mildiu y Oidio	2
Podredumbres de la uva (<i>Aspergillus</i> , <i>Botrytis</i>)	3

Grupos funcionales en suelos	Nº géneros
Bacterias fijadoras de N	6
Hongos y Bacterias movilizadores de P	18
PGPBs	150
Hongos micorrícicos	10

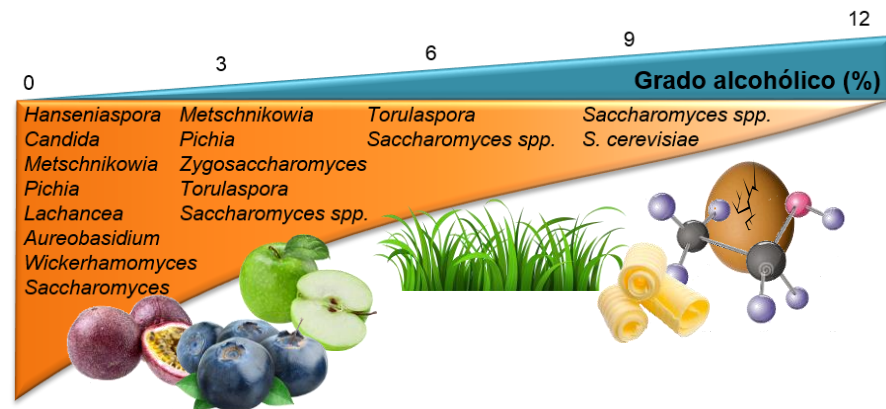
Microorganismos en uvas	Biomasa / spp
Levaduras	10 ³ -10 ⁶ / 90 spp
Bacterias	10 ³ -10 ⁴ / 50 spp



Agentes de Biocontrol;
Bacterias-Levaduras
Podredumbres de la uva;
Enfermedades de la madera

PGPBs; BFN; MMP; HM

Podredumbres de las raíces;
Enfermedades de la madera

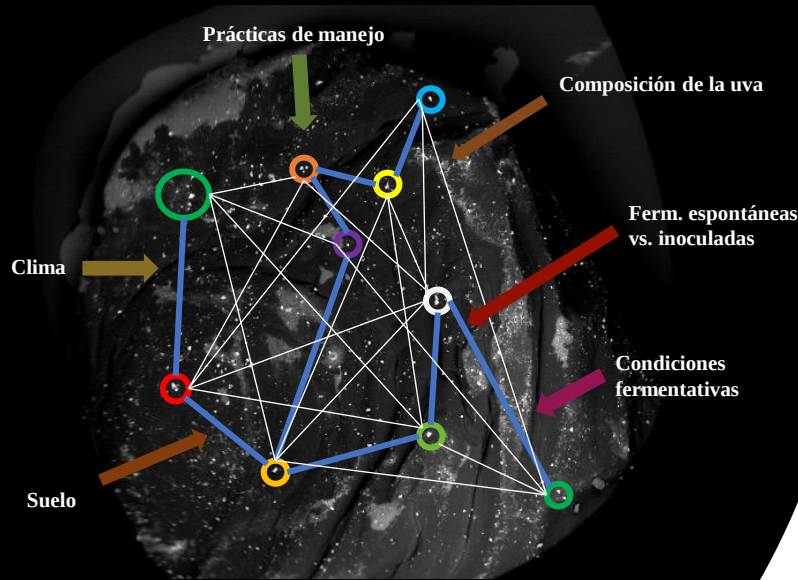


Determinantes de la calidad del vino

Retos de la investigación microbiológica en vitivinicultura

Microbioma

(comunidades complejas e interconectadas)



Scanning Electron Microscopy – hollejo uva

Hay, aprox. 10^8 células microbianas por gramo de suelo y mL de vino en fermentación

En viñedo:

- i) Más de 100 especies **potencialmente patógenas**
- ii) Más de 150 géneros **facilitando servicios ecosistémicos (biodiversidad funcional)**

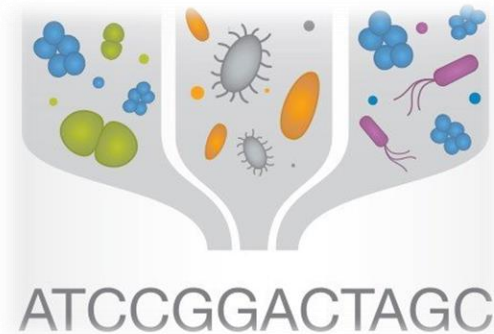
Objetivos

Entender la dimensión biogeográfica de la microbiota en los viñedos

Entender el impacto de las prácticas de manejo en la estructura y funcionamiento de la microbiota del suelo

Entender el papel de las prácticas vitivinícolas en la microbiota fermentativa de la uva

Entender el potencial y las limitaciones de la selección de cepas no-convencionales de levadura en vinificación



Análisis microbiológicos por
secuenciación masiva de ADN

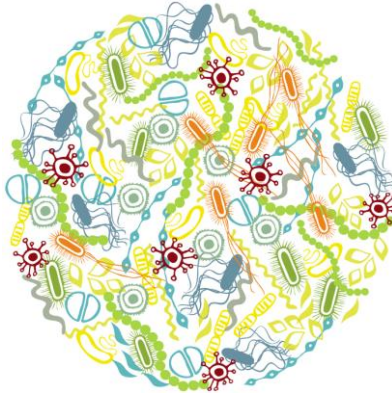
Estrategias de estudio de comunidades microbianas

Métodos dependientes de cultivo

Cultivo en placa



- ✓ Aislamiento, mantenimiento y caracterización de cepas
- ✓ Pérdida de información (microorganismos no cultivables)



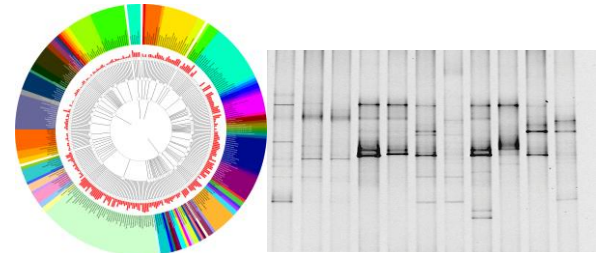
Métodos independientes de cultivo

DGGE

RFLP

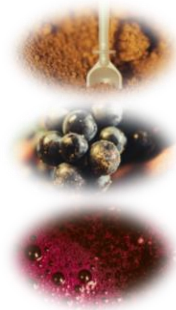
Secuenciación masiva de ADN

- metagenómica
- meta-taxonómica



- ✓ Observación “completa” de la biodiversidad
- ✓ Difícil interpretación
- ✓ Imposibilidad de estudios adicionales sobre las especies detectadas

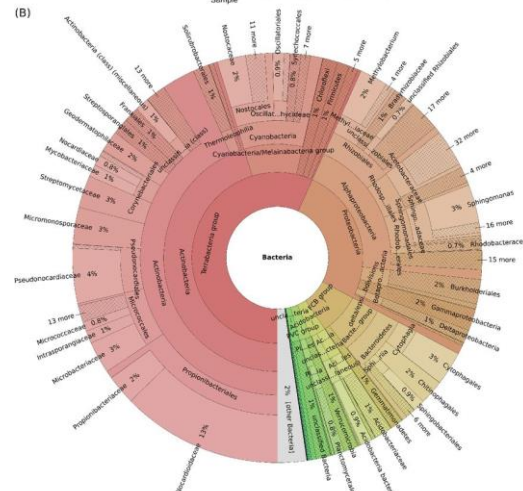
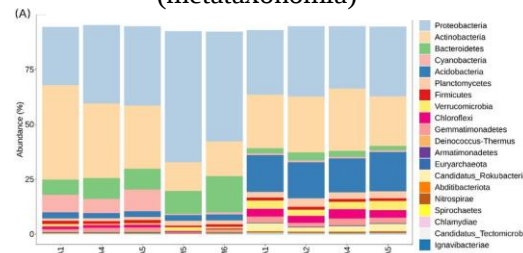
Tecnología de secuenciación de ADN para estudios microbiológicos



Extracción
de ADN

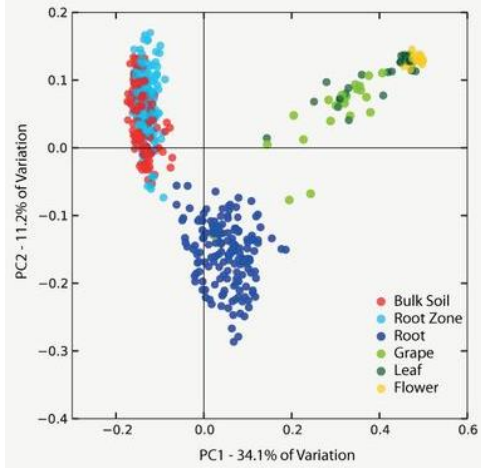


Perfil taxonómico
(metataxonomía)



Perfil funcional
(metagenómica)

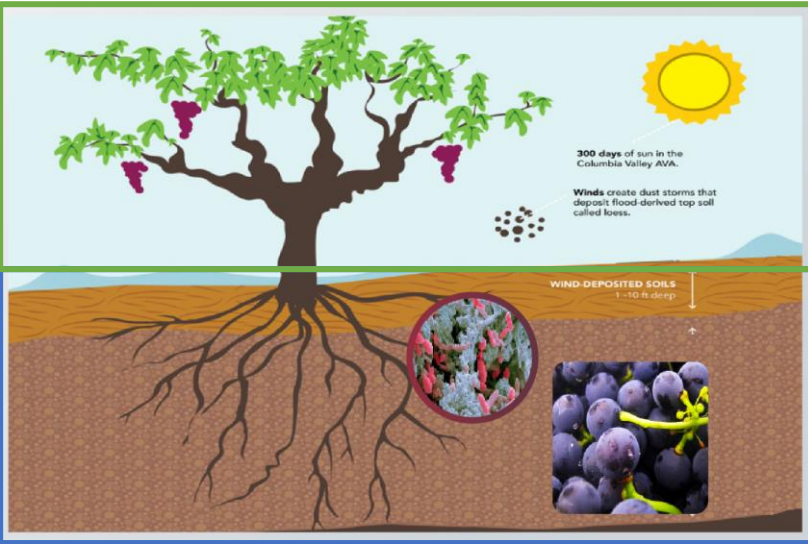
Patrones de diversidad



Gran poder comparativo
Limitado poder descriptivo



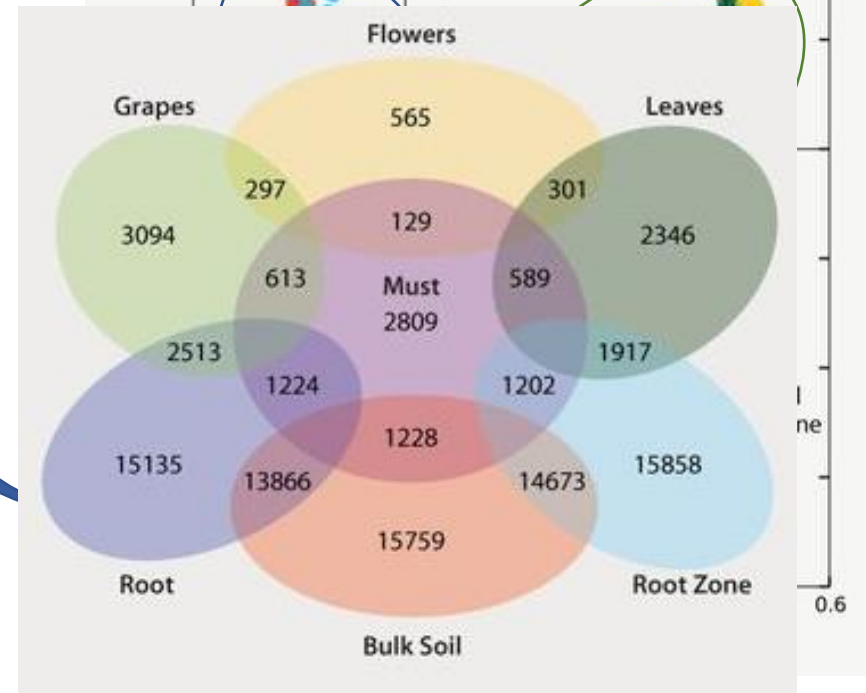
Distribución de la microbiota en el viñedo



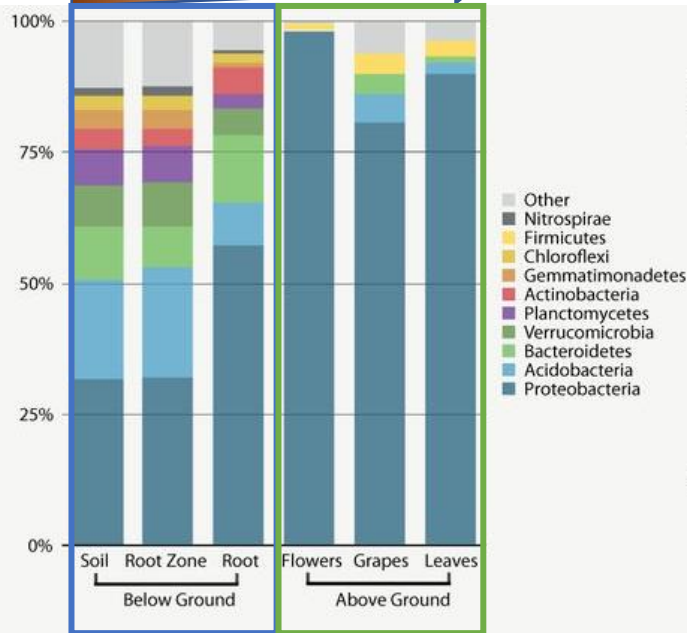
Partes
aéreas

Bajo
tierra

El suelo es el reservorio de la microbiota del viñedo



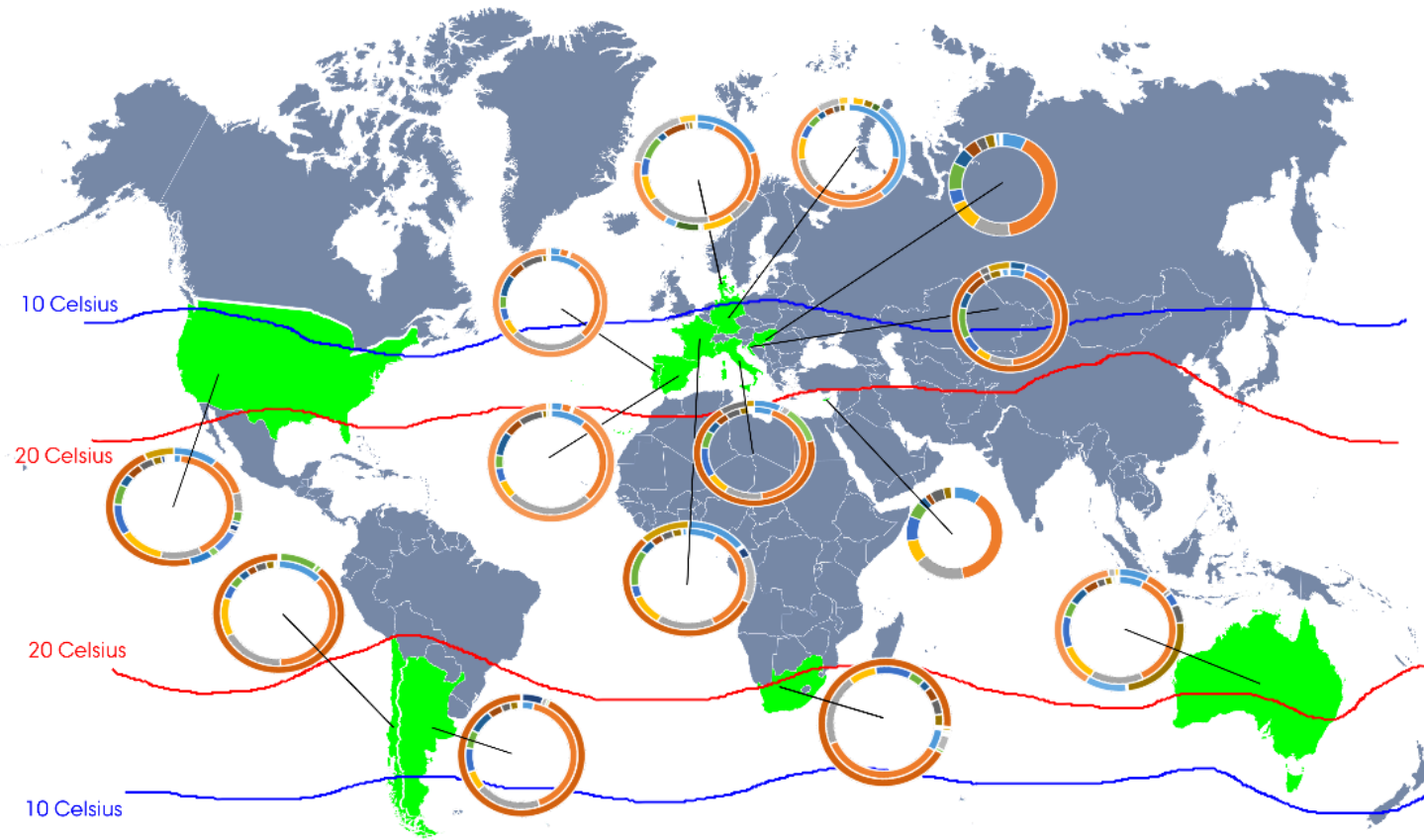
Diversidad (riqueza)



Importancia de parámetros edáficos en la composición de la microbiota de los suelos

Mantel test	r	p
pH	0.611	0.001
C:N	0.442	0.001
Carbon	0.158	0.001
Soil Temp	0.155	0.001
Moisture	0.125	0.005
Nitrogen	0.104	0.031

Mapa microbiológico global de los viñedos



Muestreo

250 muestras suelo

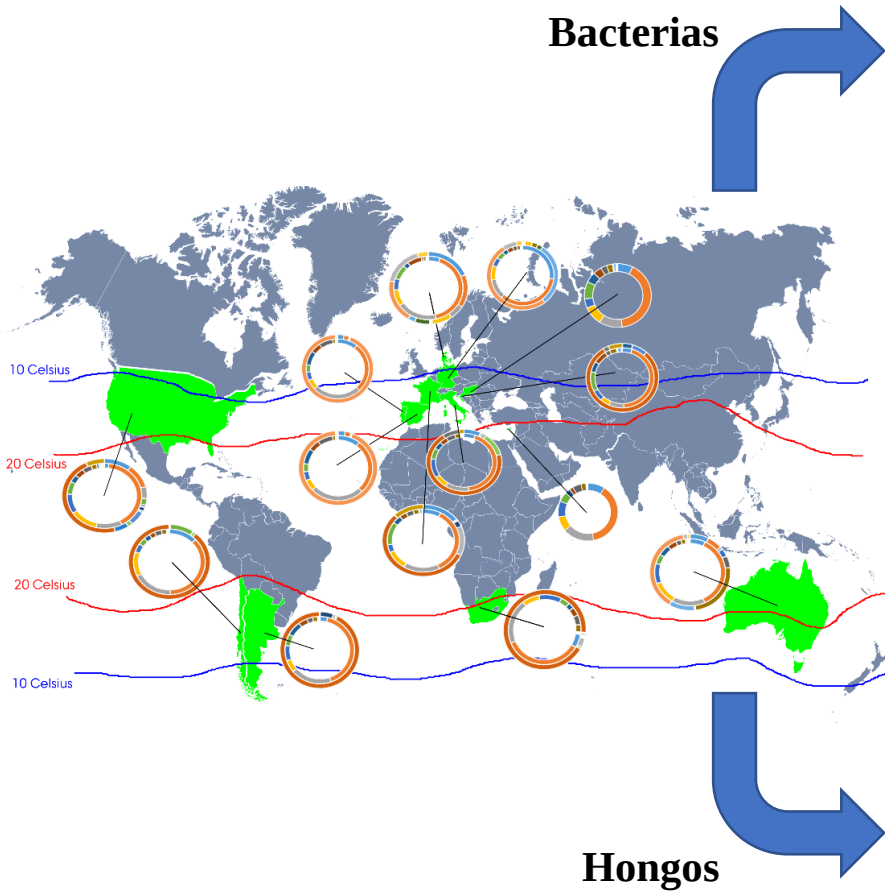
14 países

5 continentes

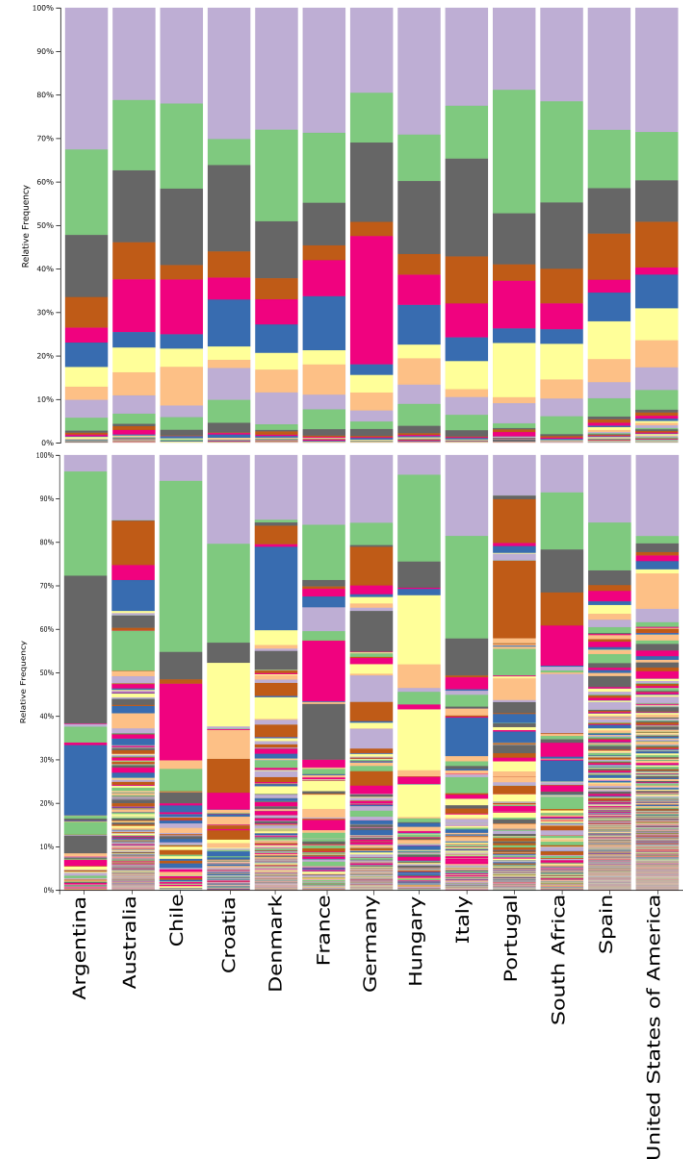
Metodología (NGS)

Comunidades
Fúngicas
y
Bacterianas

Patrones geográficos en la microbiota de los suelos

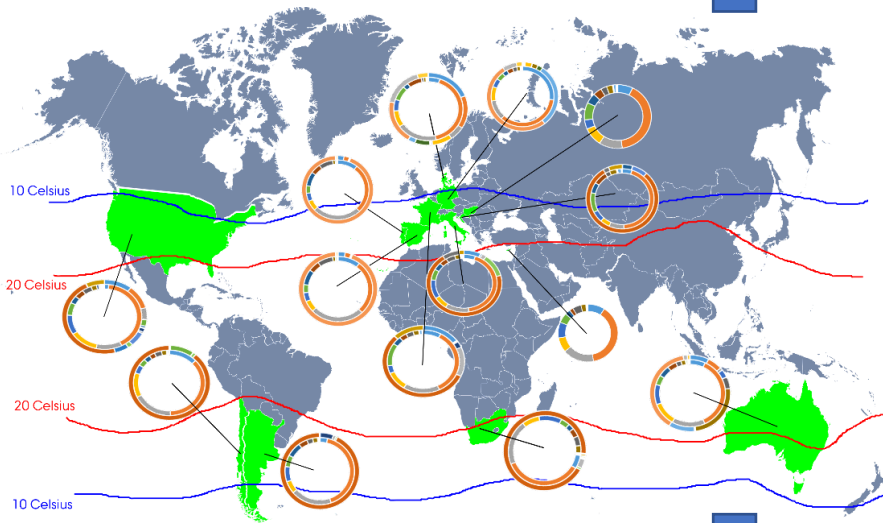


Perfil taxonómico

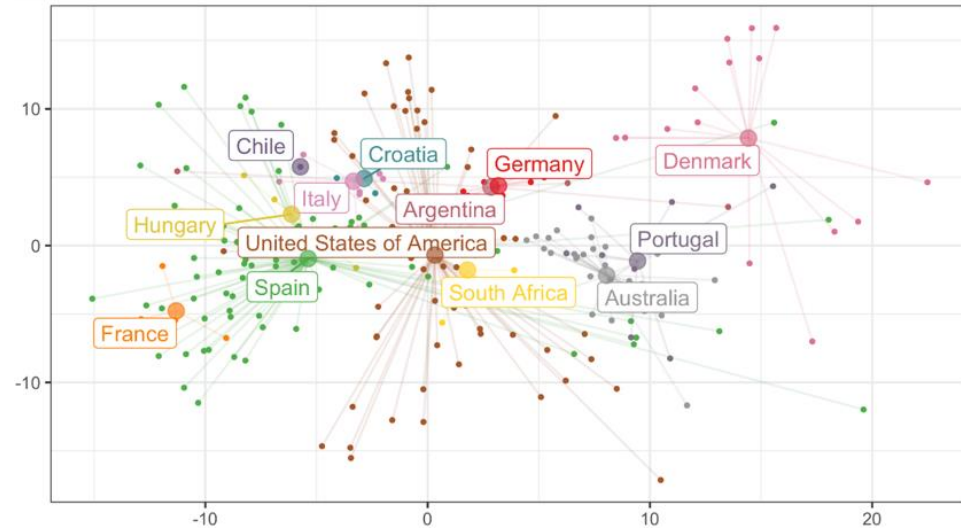


Patrones geográficos en la microbiota de los suelos

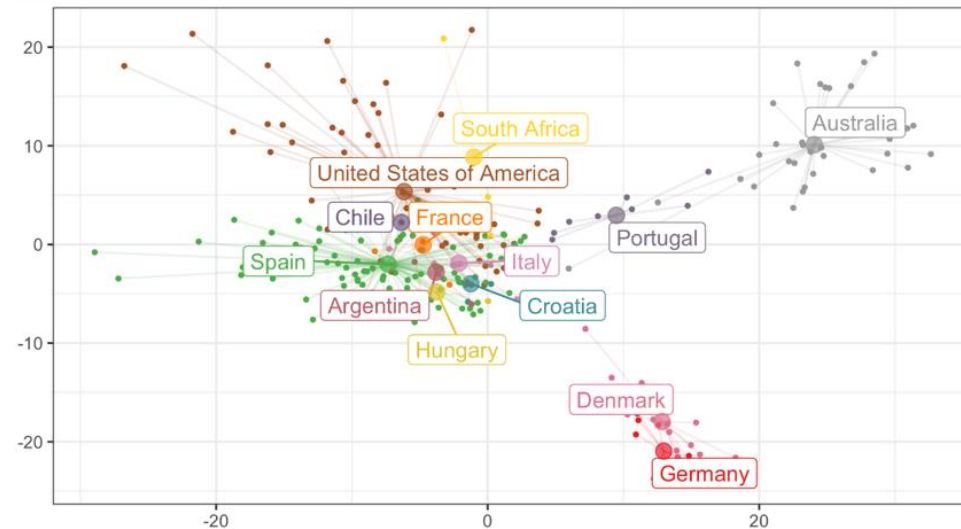
Bacterias



Hongos

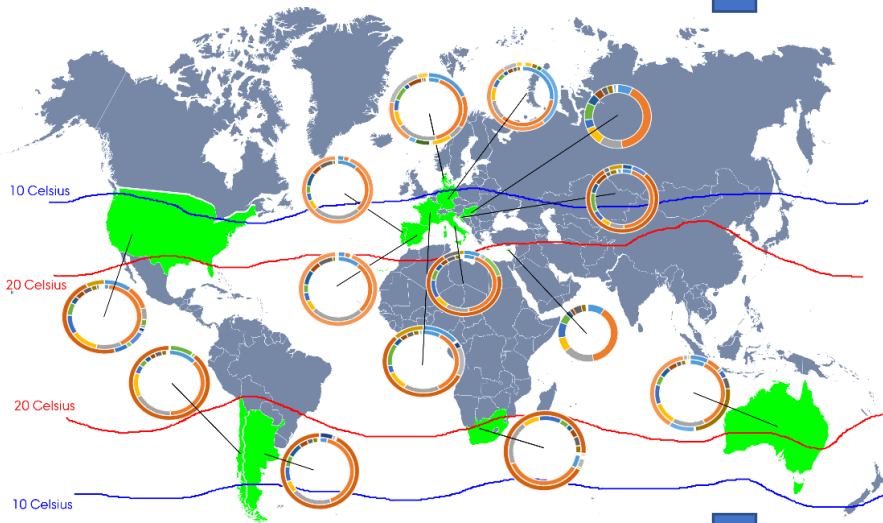
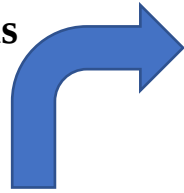


La microbiota de los suelos presenta **patrones biogeográficos a nivel global**, determinados por: limitaciones en la dispersión, clima, suelo

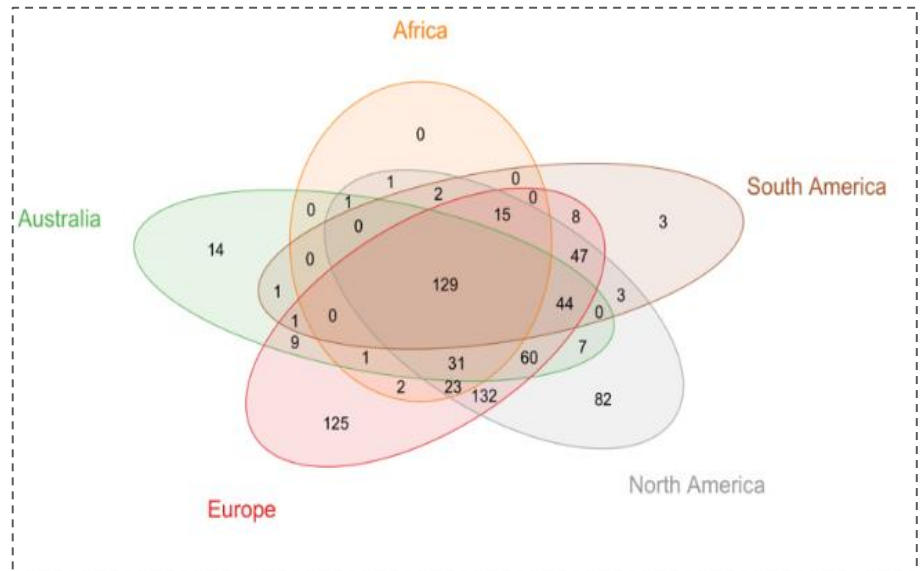


Patrones geográficos en la microbiota de los suelos

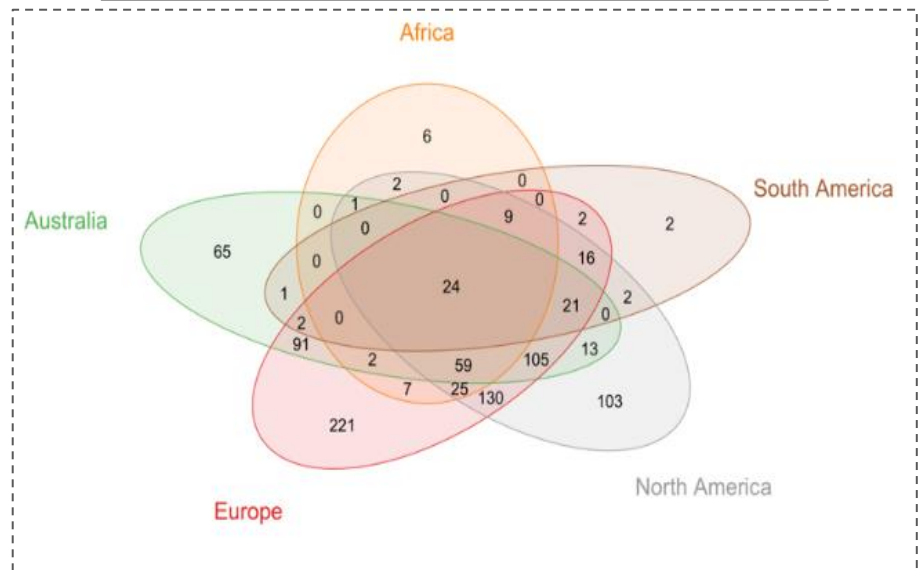
Bacterias



Hongos

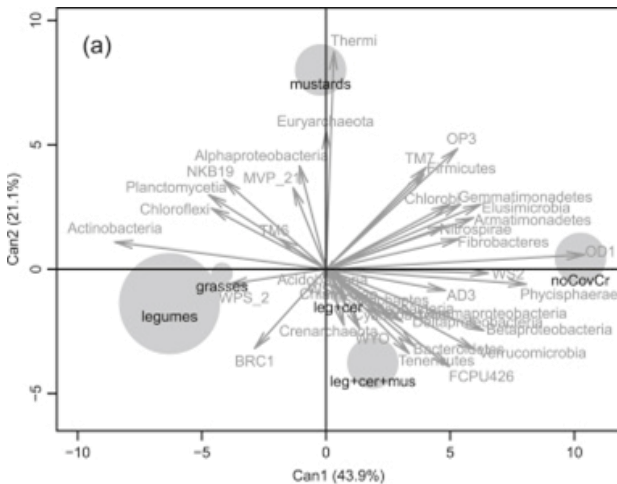


Es posible predecir el origen de una muestra de suelo
atendiendo a su composición microbiana
(efecto: biogeografía > clima)

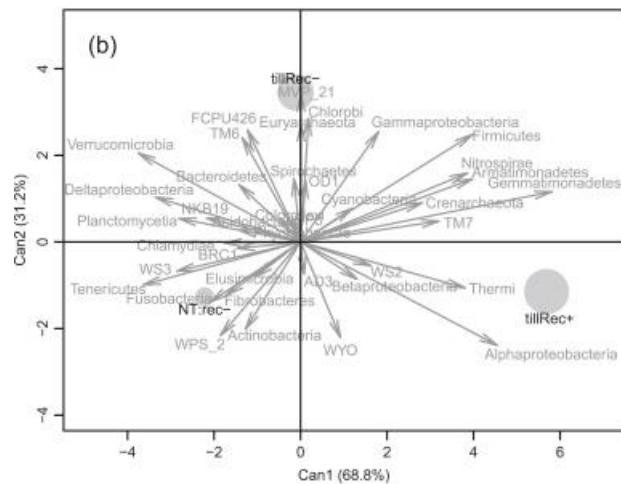


Efecto de las prácticas de manejo en la microbiota del viñedo

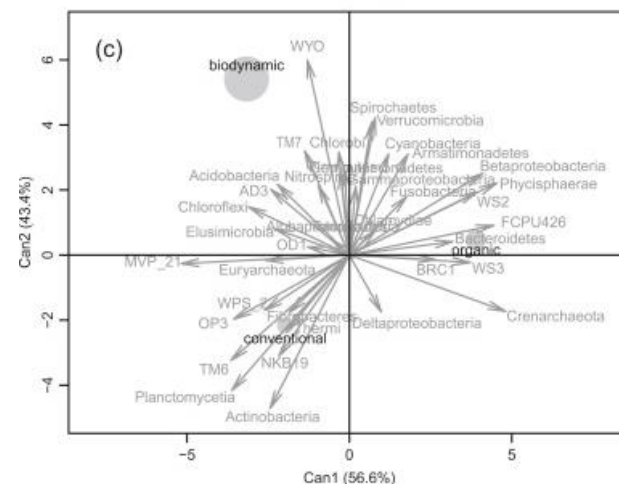
Cobertura herbácea



Frecuencia de arado



Sistema de manejo

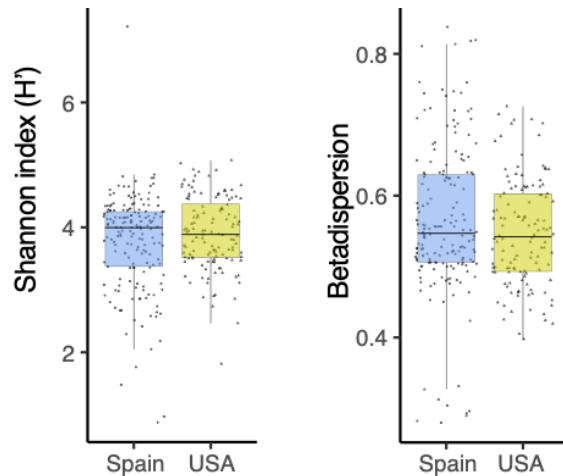


Burns et al., 2016

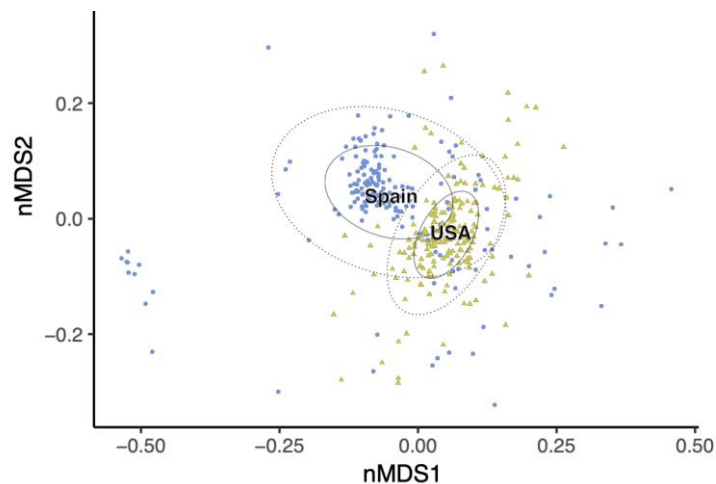
El tipo de manejo y enmiendas aplicadas en el viñedo modifican la microbiota de los suelos



Impacto de las prácticas vitícolas en la microbiota del suelo



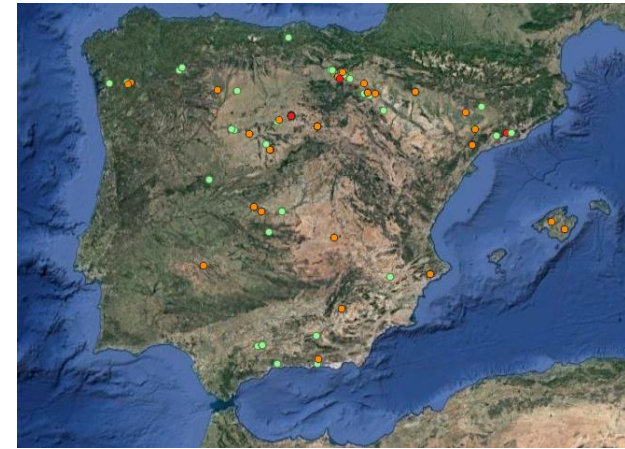
Las comunidades fúngicas de los suelos presentan niveles de diversidad comparables entre países; a pesar de los distintos patrones composicionales



USA (n=175)

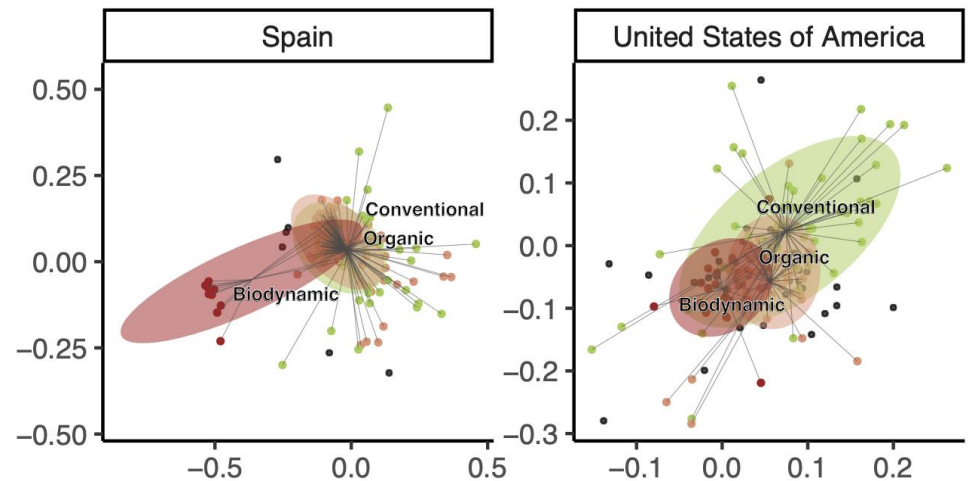


España (n=175)



Convencional – Ecológico – Biodinámico

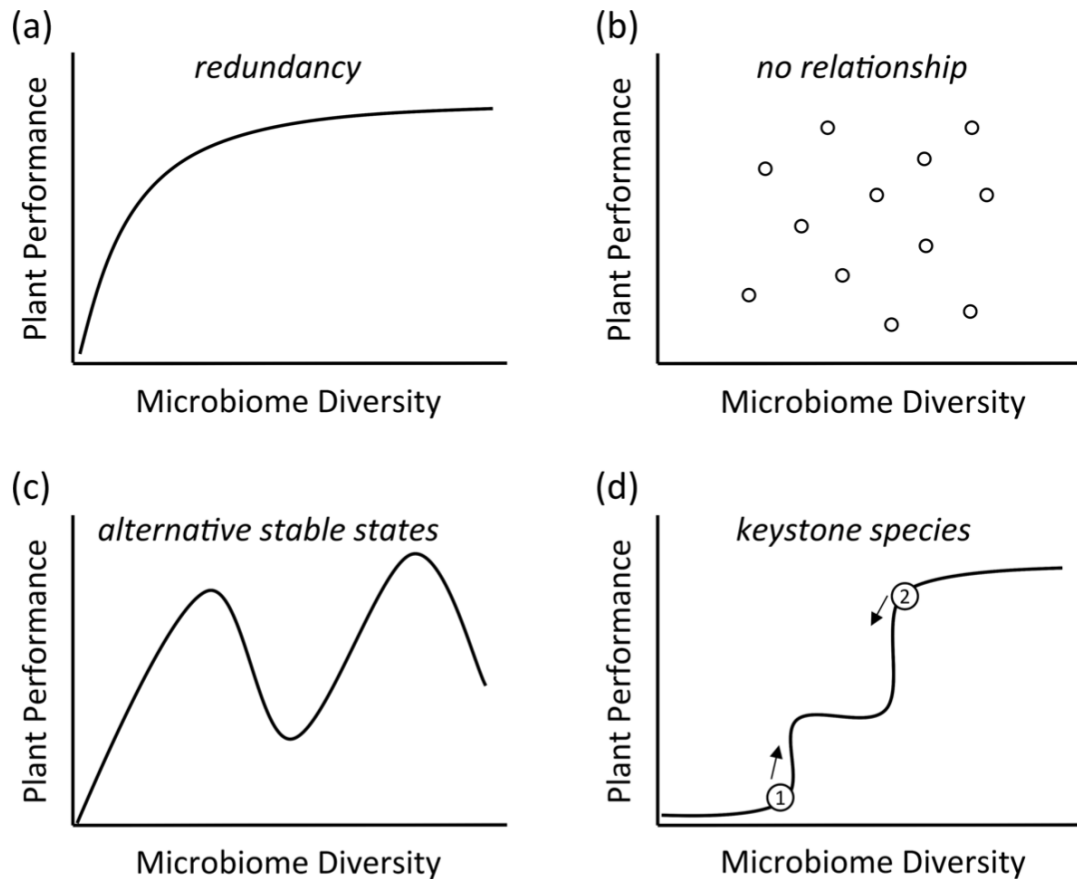
El tipo de prácticas aplicadas en el viñedo afectan la composición de las comunidades microbianas



Relación teórica entre biodiversidad y sostenibilidad

Una mayor biodiversidad tiende a promover una mejor sostenibilidad del ecosistema, a través de una mayor resistencia y resiliencia de las comunidades. *Cleland et al., 2011. Nature*

Debate “diversidad-estabilidad” de los ecosistemas

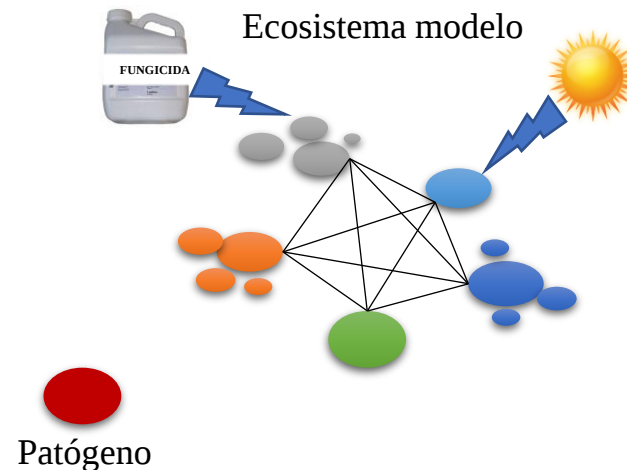


Relación teórica entre biodiversidad y sostenibilidad

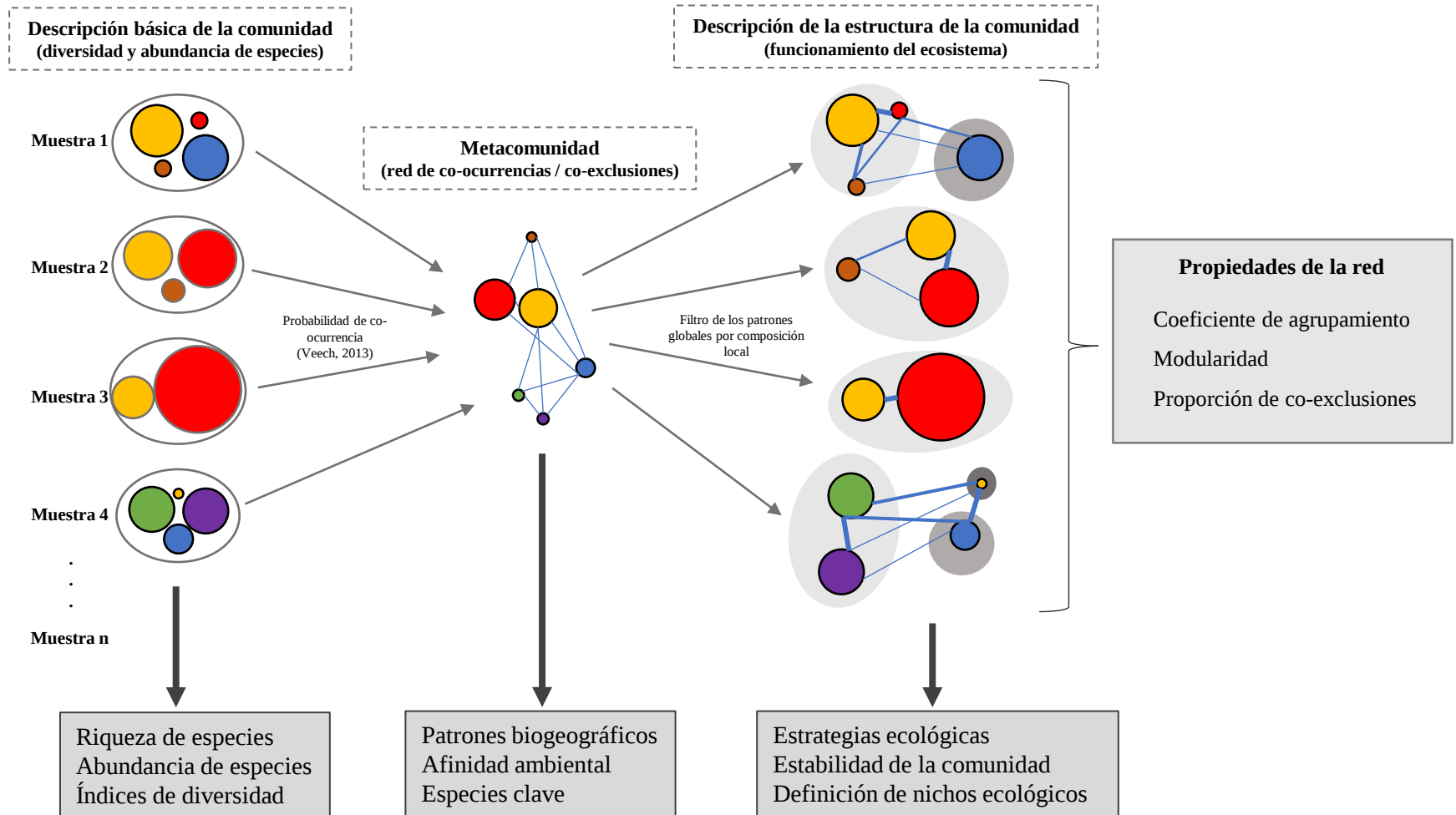
Una mayor biodiversidad tiende a promover una mejor sostenibilidad del ecosistema, a través de una mayor resistencia y resiliencia de las comunidades. *Cleland et al., 2011. Nature*

Debate “diversidad-estabilidad” de los ecosistemas

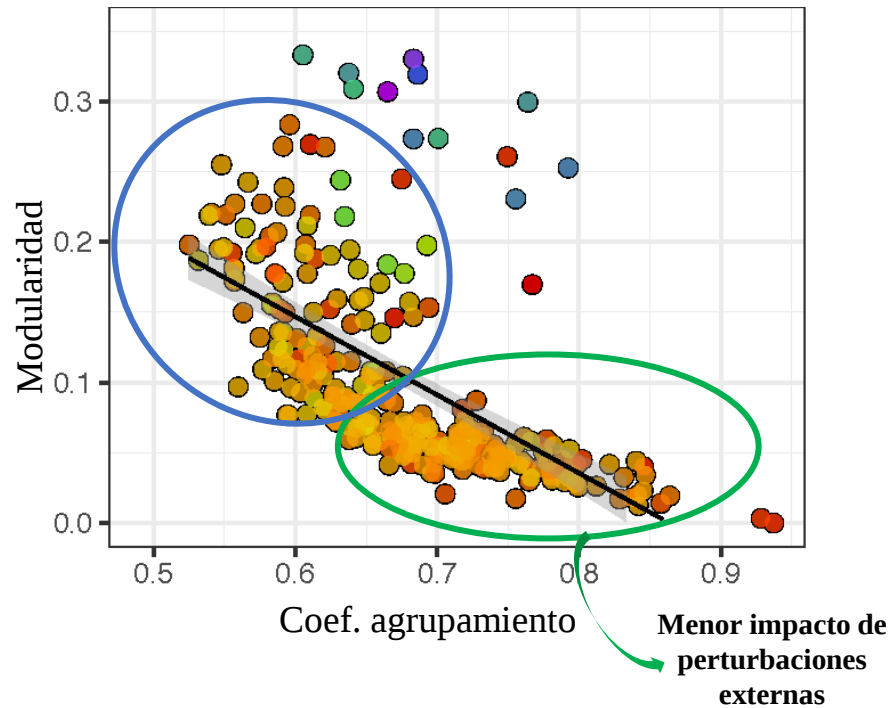
- Una mayor diversidad favorece el establecimiento de interacciones interespecíficas, e incrementa la estabilidad de las comunidades.
- Una mayor diversidad de especies en el ecosistema mejora su productividad y el desarrollo de los procesos biológicos.
- Con varias especies ocupando el mismo nicho ecológico, la respuesta a factores de estrés externo, es más estable.



Entendiendo la estructura de comunidades microbianas

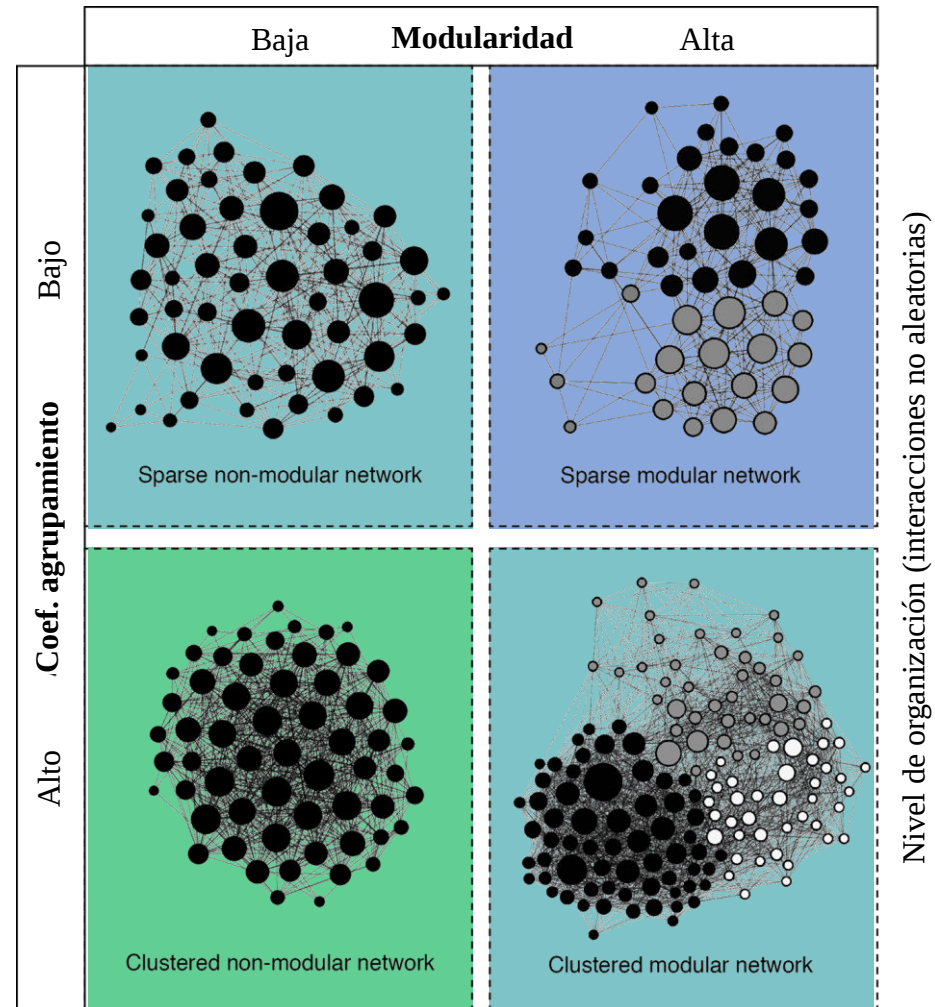


Ecología de comunidades y teoría de redes para la comprensión del microbioma



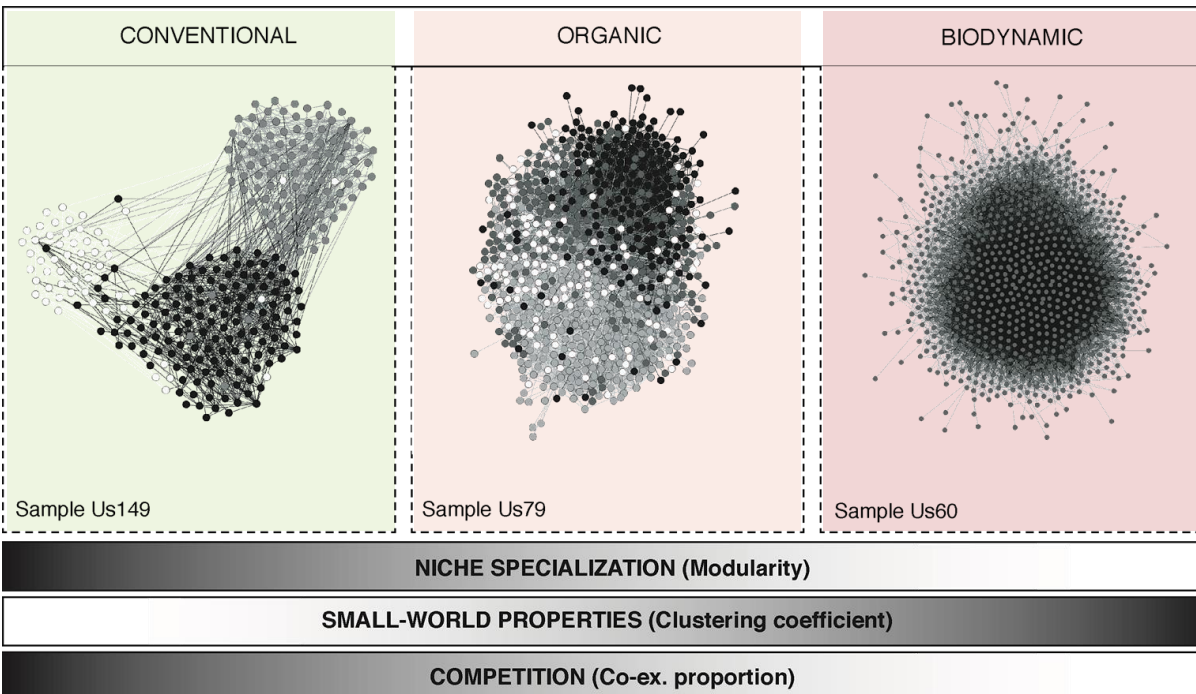
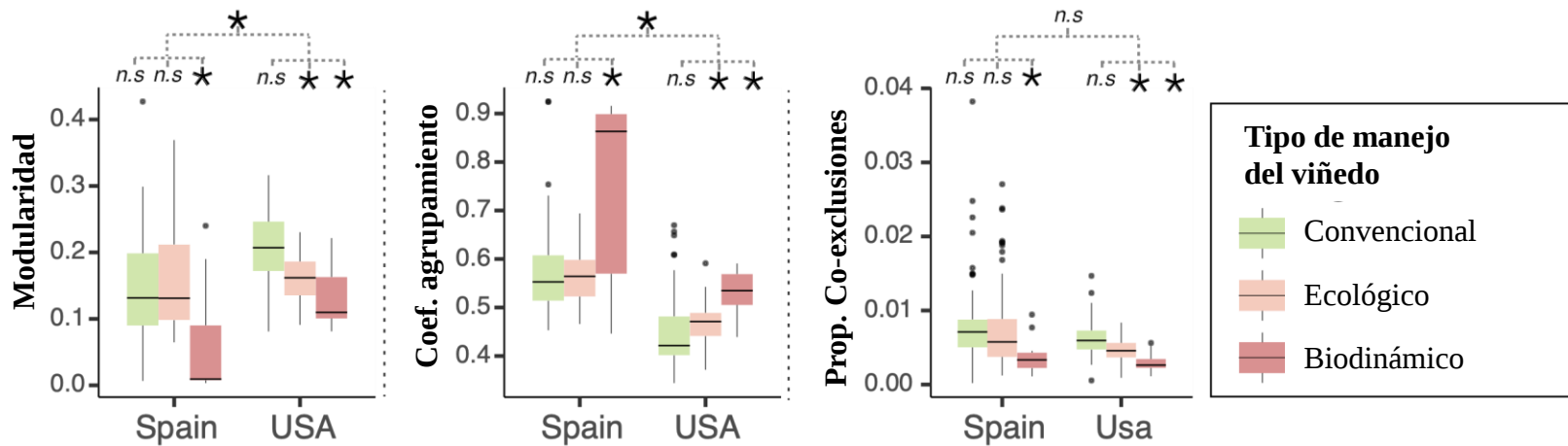
El tipo de **manejo** es el principal elemento que **determina la estructura** de las comunidades microbianas en el suelo

Variable	Modularidad	Co. agrupamiento	Prop. coexclusiones
Manejo convencional	$-1.650 \pm 0.114^{***}$	$-0.737 \pm 0.072^{***}$	$-5.110 \pm 0.128^{***}$
Manejo ecológico	$-1.691 \pm 0.113^{***}$	$-0.738 \pm 0.072^{***}$	$-5.173 \pm 0.130^{***}$
Manejo biodinámico	$-2.410 \pm 0.149^{***}$	$-0.514 \pm 0.074^{***}$	$-6.073 \pm 0.258^{***}$
Humedad	$-0.126 \pm 0.028^{***}$	$0.048 \pm 0.014^{***}$	$-0.182 \pm 0.055^{***}$
Temperatura	$-0.086 \pm 0.032^{**}$	$0.082 \pm 0.014^{***}$	-0.105 ± 0.056



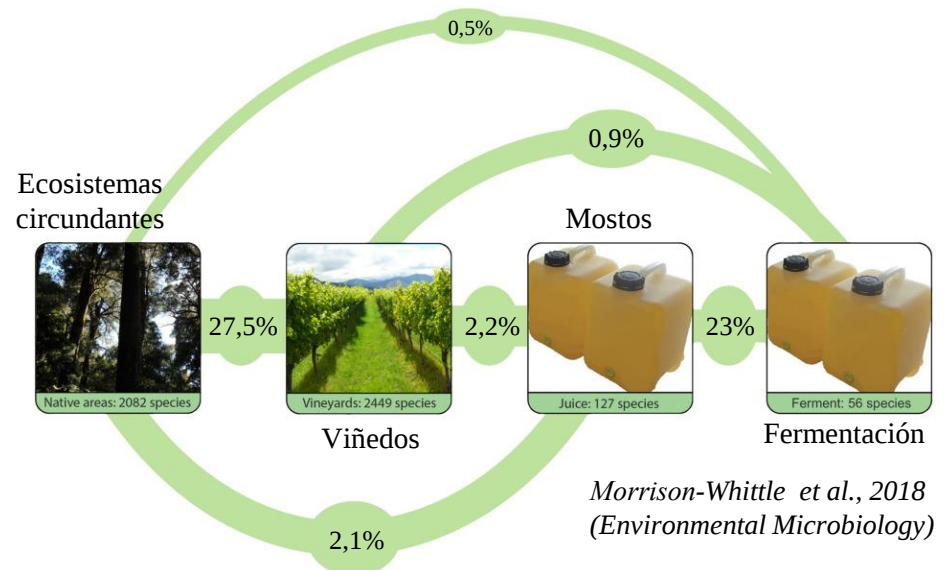
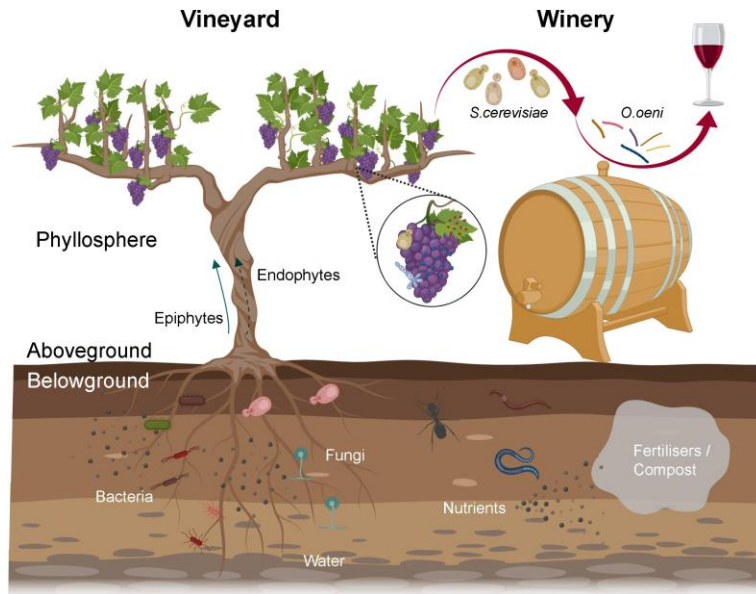
Nivel de interacción entre nichos o especies

Las prácticas de manejo determinan la estructura de comunidades microbianas del suelo



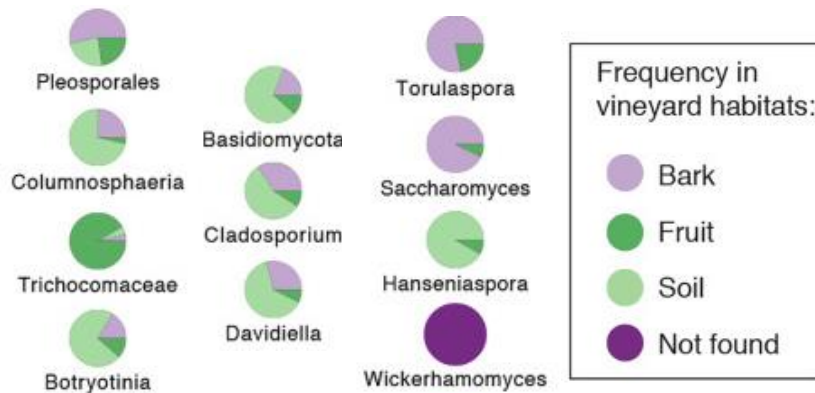
El grado de intensificación en el manejo determina la estructura y funcionamiento de las comunidades microbianas (fúngicas); desde comunidades con un **alto grado de especialización de nicho y competición**, hasta comunidades que favorecen un **alto grado interacción** entre sus miembros

Microbiota fermentativa en el viñedo

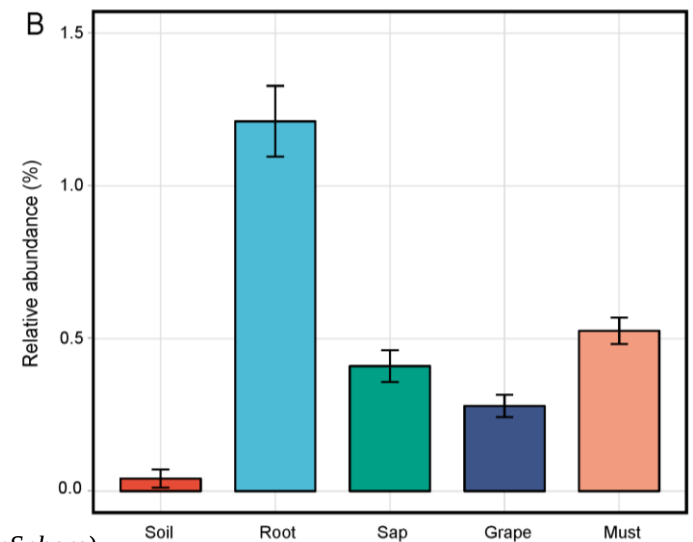


Liu et al., 2019 (Front. Microbiology)

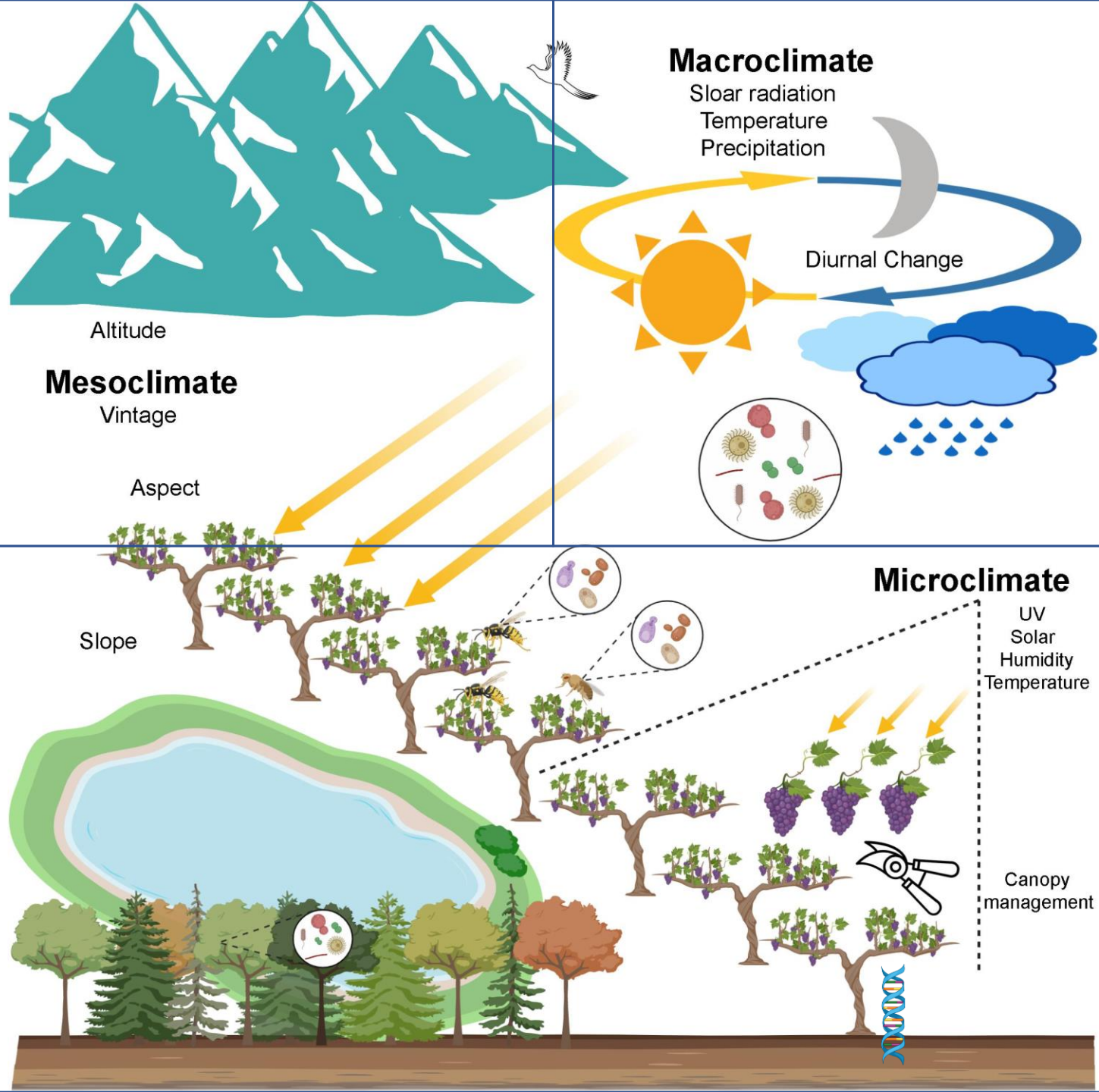
Distribución de hongos y levaduras por hábitats en el viñedo



S. cerevisiae en el viñedo

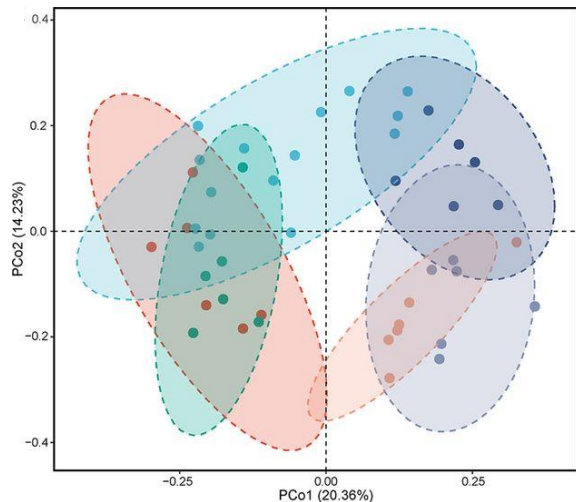


Liu et al., 2020 (mSphere)

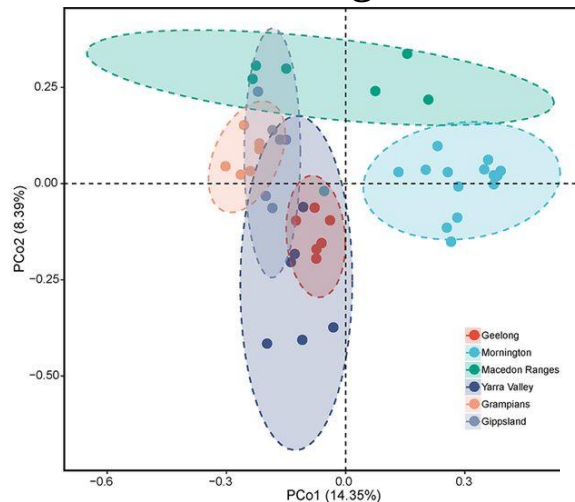


Impacto de la microbiota del viñedo en el vino

bacterias

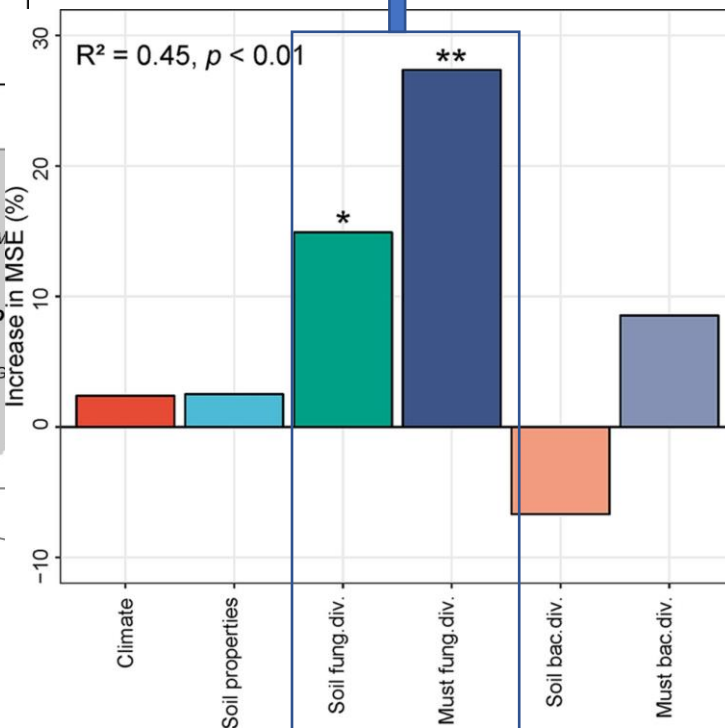
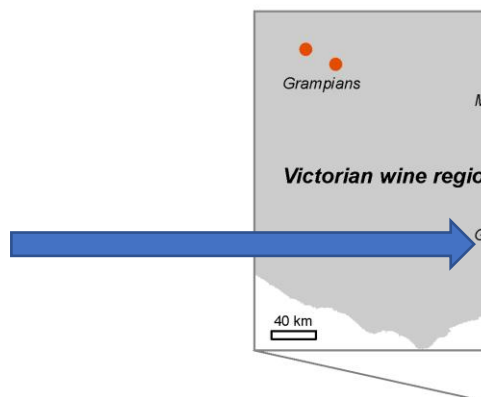
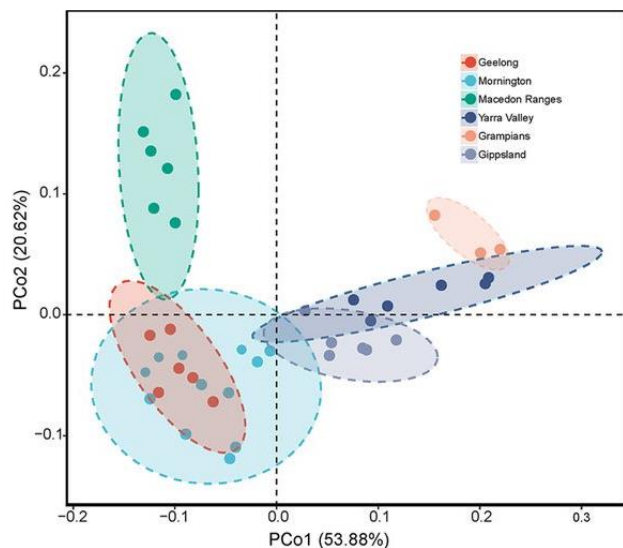


hongos

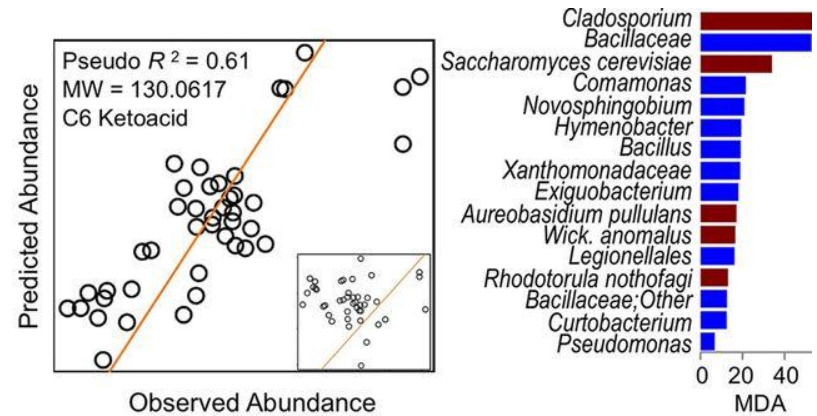
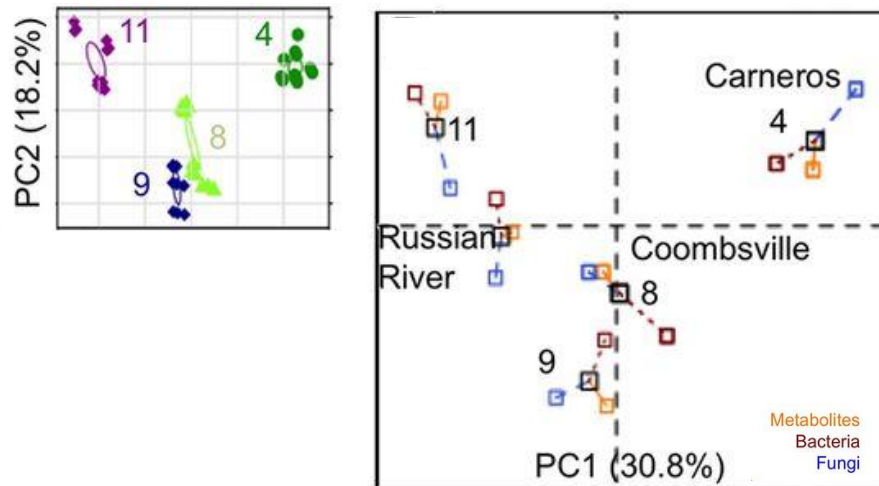


La diversidad fúngica del suelo y del mosto son los principales factores que explican la composición química del vino

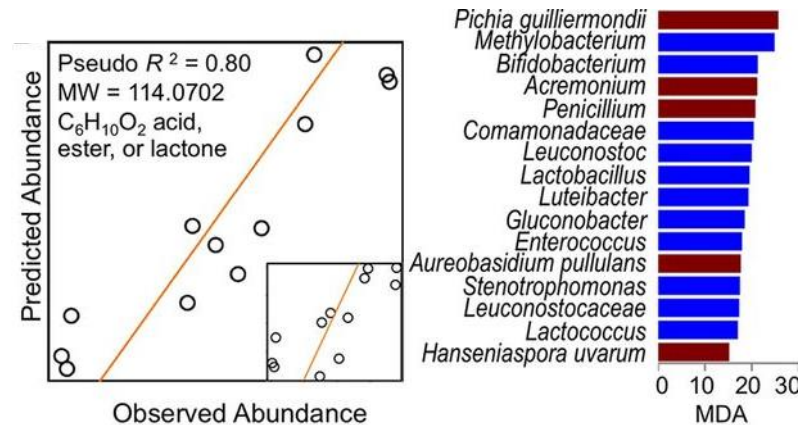
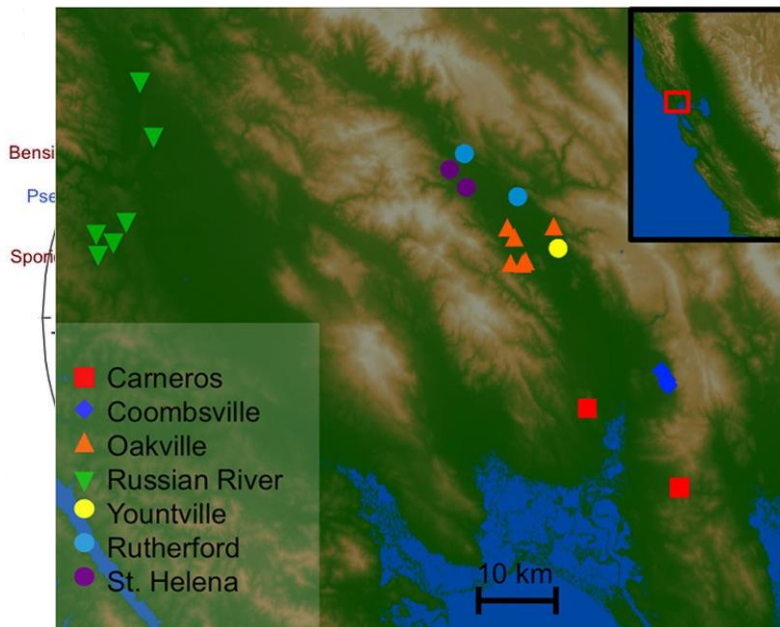
Compuestos volátiles vino



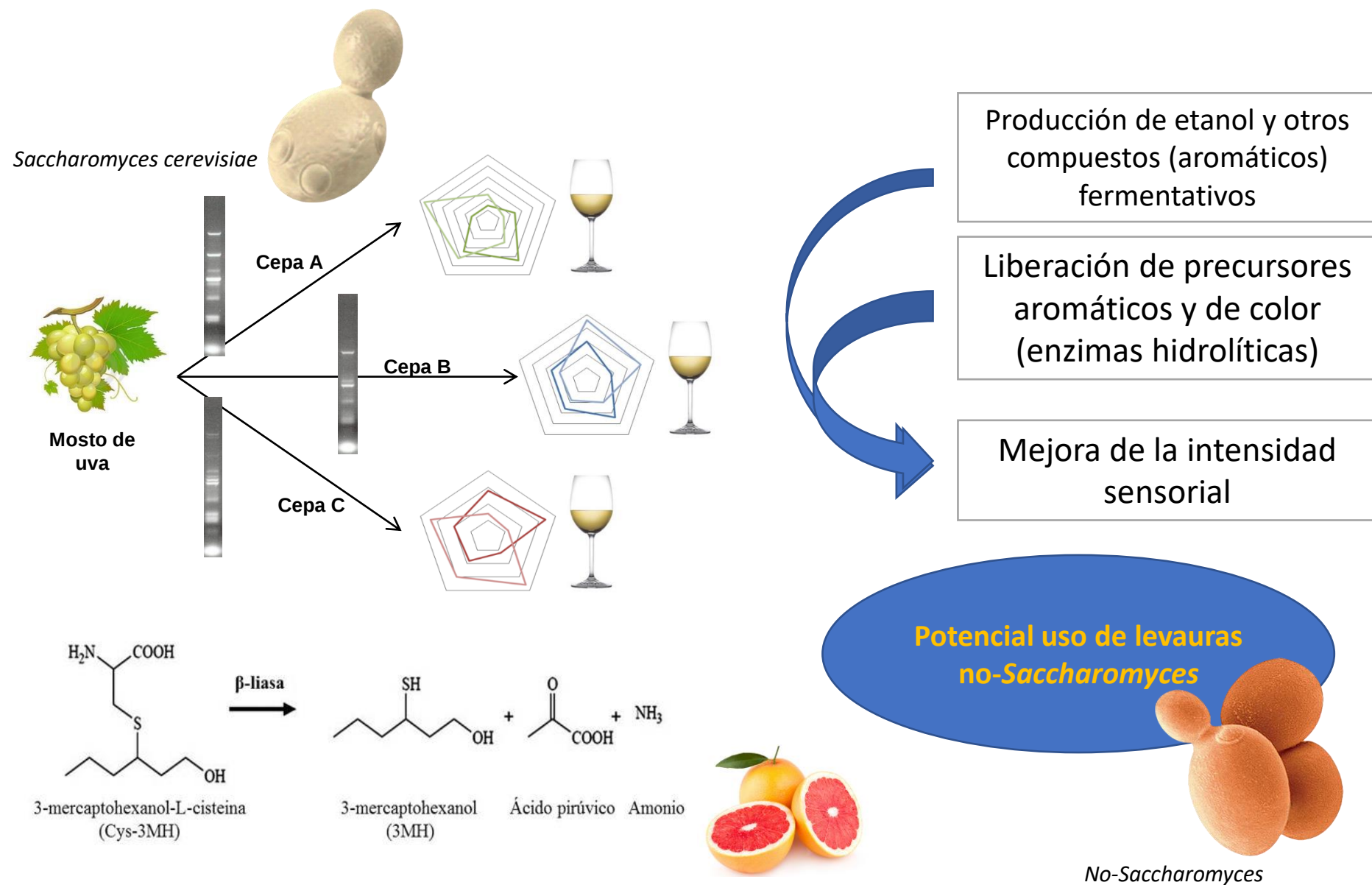
¿Existe correlación entre la microbiota de la uva y el perfil volátil de los vinos?



Dentro de los límites varietales, es posible predecir la abundancia de ciertos compuestos aromáticos a partir de la microbiota del mosto



Papel de las levaduras en las propiedades sensoriales de los vinos



Potencial enzimático de levaduras no-*Saccharomyces*

Glicosidasas



Terpenos (Linalool, nerol, α -terpineol, etc)

β -liasa



Compuestos Tiólicos
(4MSP, 3SH, 3SHA)

Pectinasas

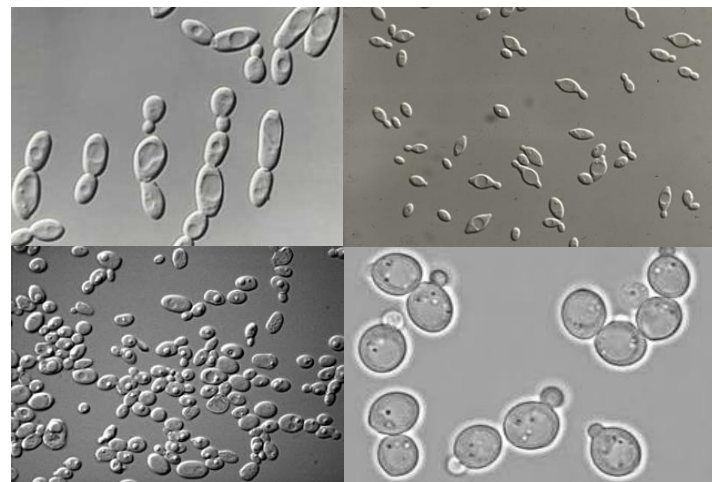


- Clarificación
- Liberación de pigmentos

Proteasa



Reducción riesgo quiebra proteica



Especies no-*Saccharomyces* de relevancia

Torulaspora delbrueckii

Lachancea thermotolerans

Metschnikowia pulcherrima

Pichia kluyveri



Propiedades sensoriales

Propiedades tecnológicas



Selección levaduras de interés enológico

Colección



5 variedades de uva

**3 Denominaciones de origen
(2012-2014)**

Aislamiento



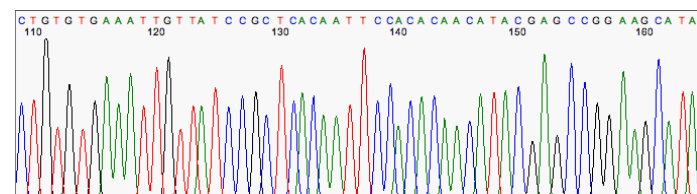
**770
aislamientos**

Crioconservación



**1440 criotubos
(-80°C)**

Identificación molecular



rDNA 26S



Diversidad taxonómica y funcional en la colección de levaduras

770 aislamientos

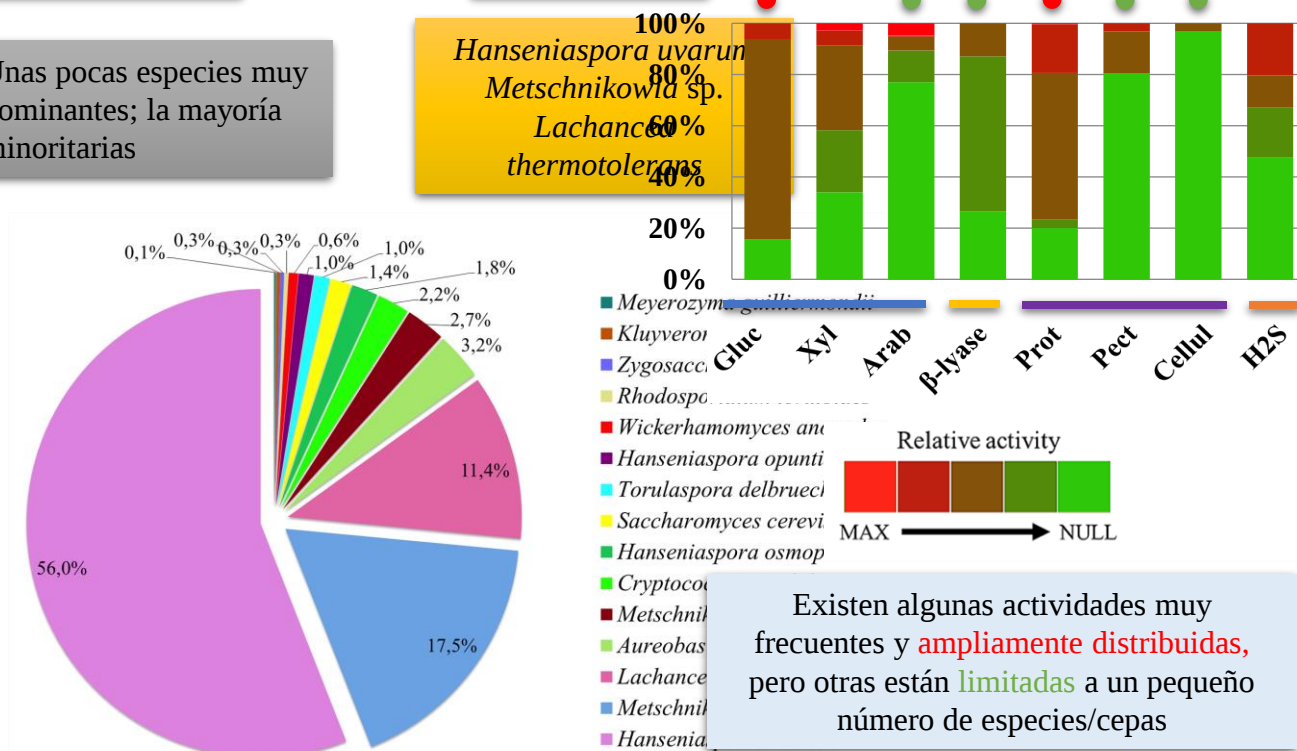
Unas pocas especies muy dominantes; la mayoría minoritarias

15 especies

100%
80%
60%
40%
20%
0%

Hanseniaspora uvarum
Metschnikowia sp.
Lachancea thermotolerans

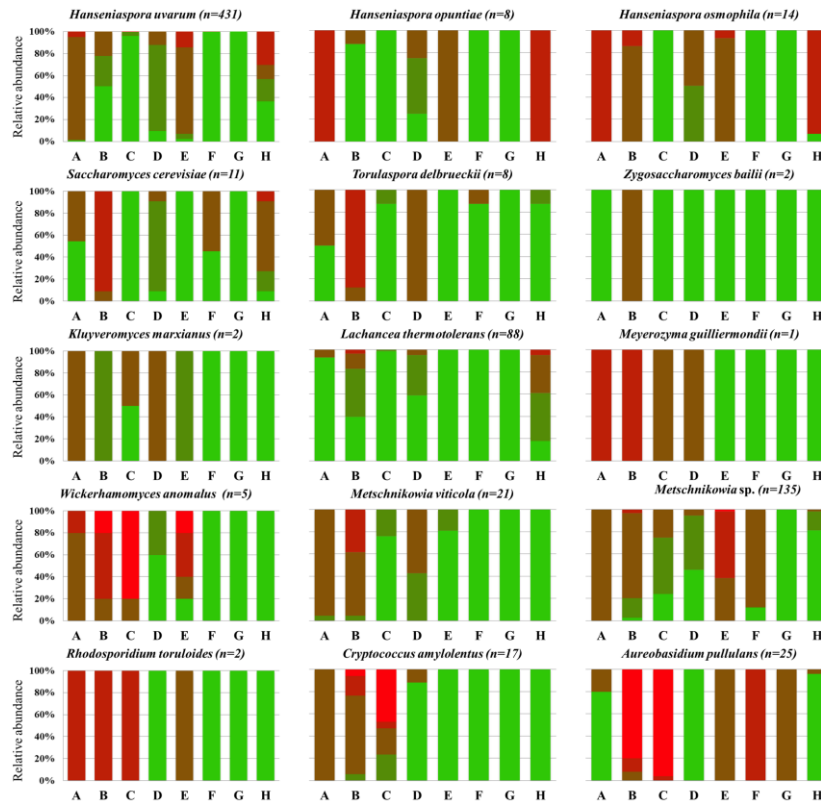
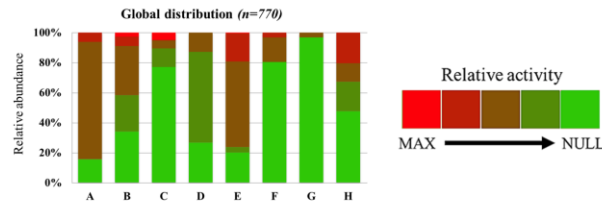
Incidencia global de actividades enzimáticas



Existen algunas actividades muy frecuentes y **ampliamente distribuidas**, pero otras están **limitadas** a un pequeño número de especies/cepas

Diversidad taxonómica y funcional en la colección de levaduras

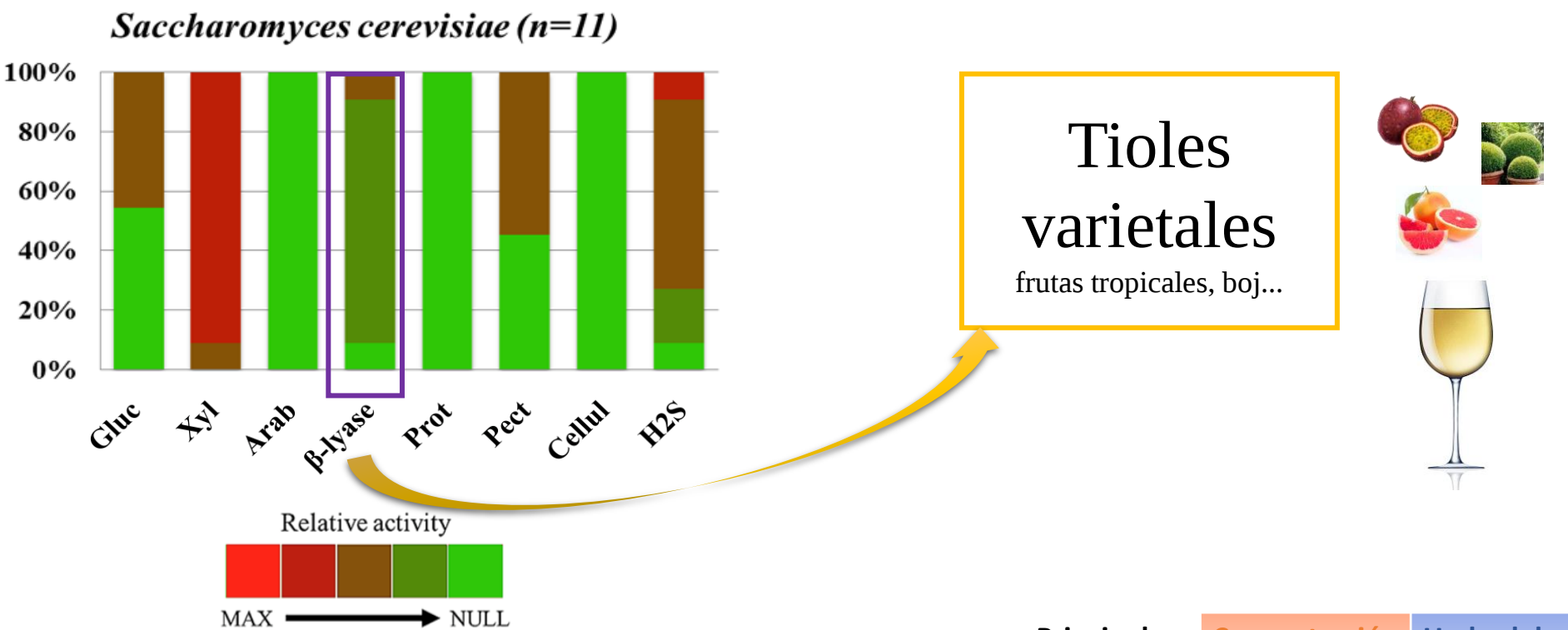
Producción de enzimas hidrolíticas por levaduras vínicas



Existen grupos de
especies (relacionada
filogenéticamente) con
patrones de actividad
similares

A: β -glucosidasa
B: β -xilosidasa
C: α -arabinofuranosidas
D: β -liasa
E: Proteasa
F: Pectinasa
G: Celulasa
H: H_2S

Selección dirigida de levaduras



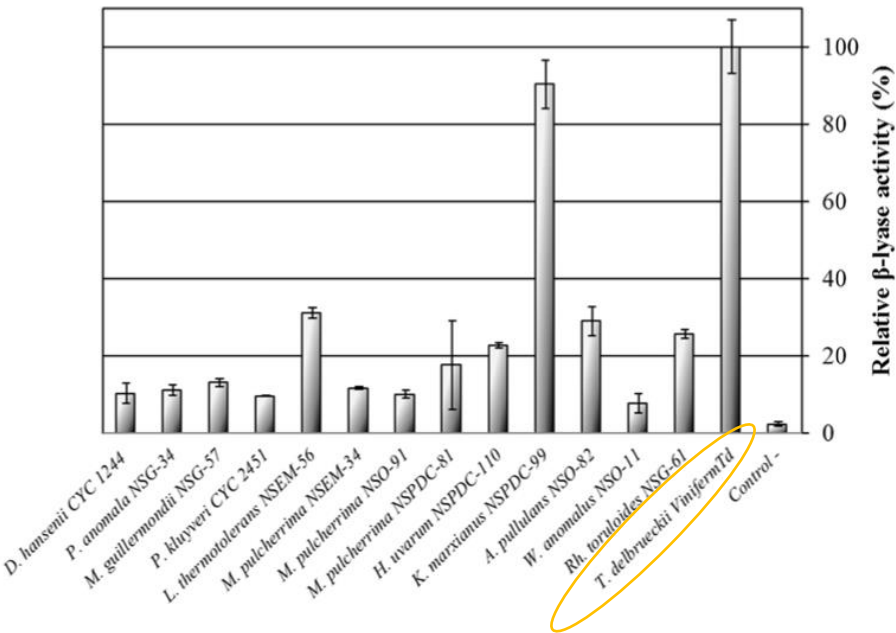
La actividad β-liasa aparece en un número muy restringido de levaduras vínicas

Es especialmente escasa (y poco funcional) en *S. cerevisiae*

- Baja concentración
- Muy bajo umbral de percepción
- **Conjugado con aminoácidos (Cys/Glu) en el mosto**

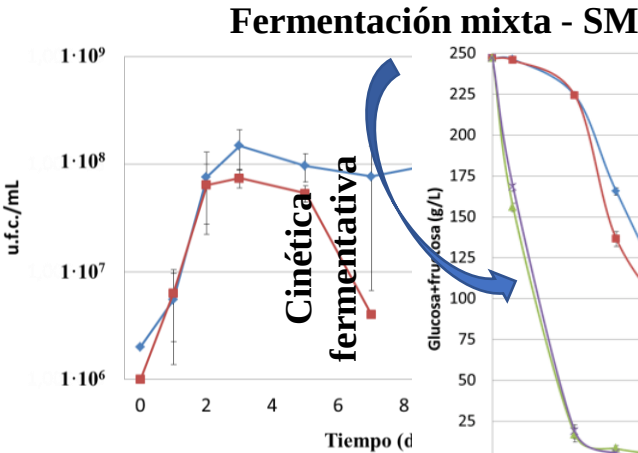
Principales tioles varietales	Concentración en vinos (ng/L)	Umbral de detección (ng/L)
3SH	700-13,000	60
4MSP	4-25	0,8

Selección dirigida de levaduras

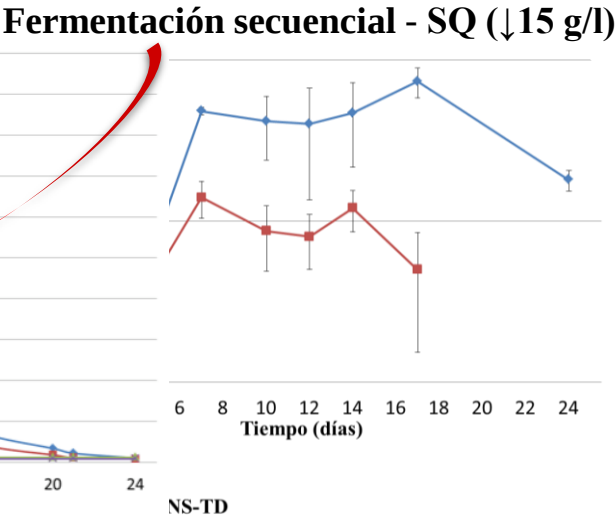
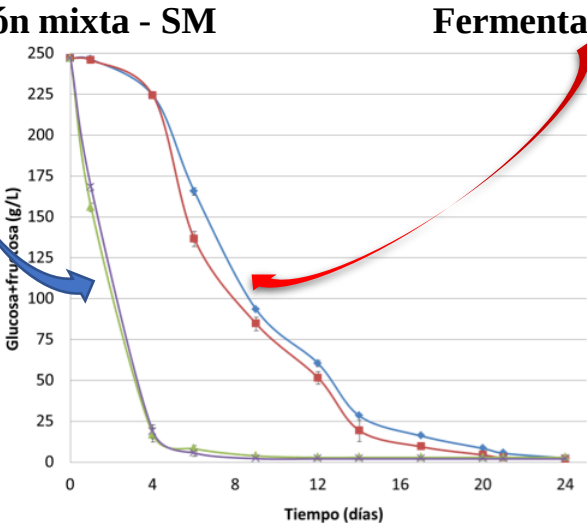


Ensayos en de fermentación (Secuencial y mixta) con *T. delbrueckii*+*S. cerevisiae*

Dinámicas poblacionales

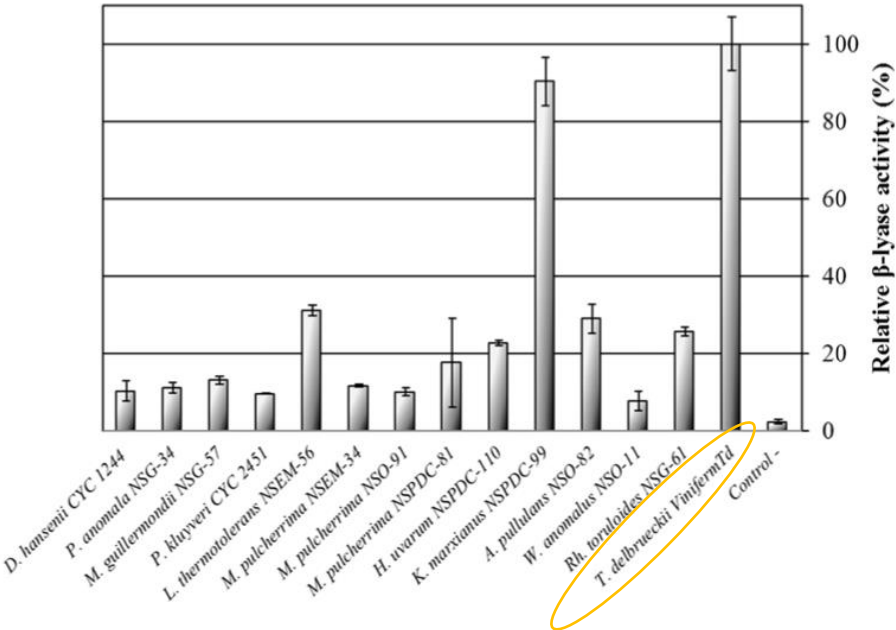


Cinética fermentativa

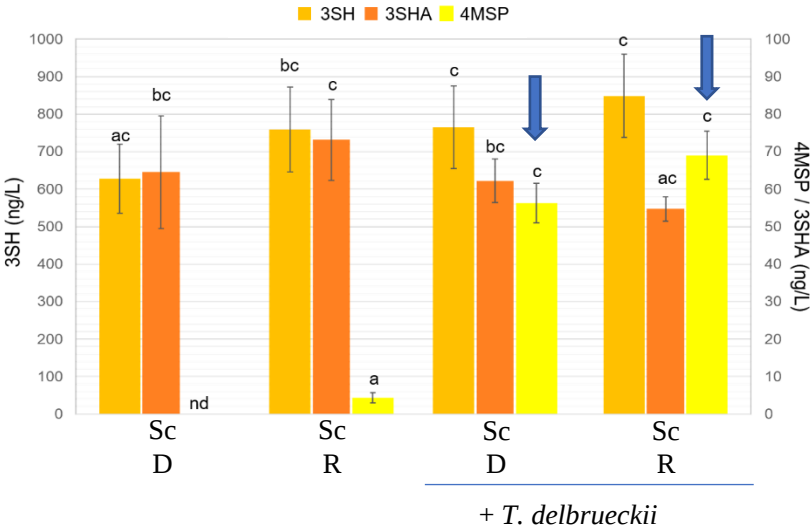
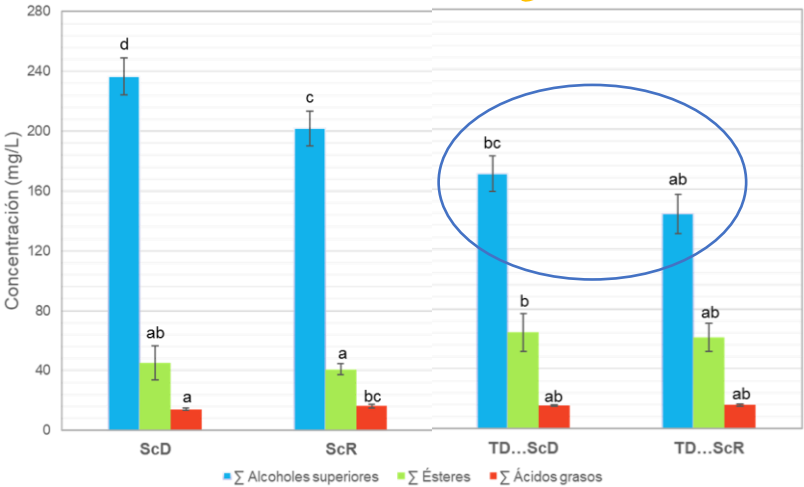


NS-TD

Selección dirigida de levaduras

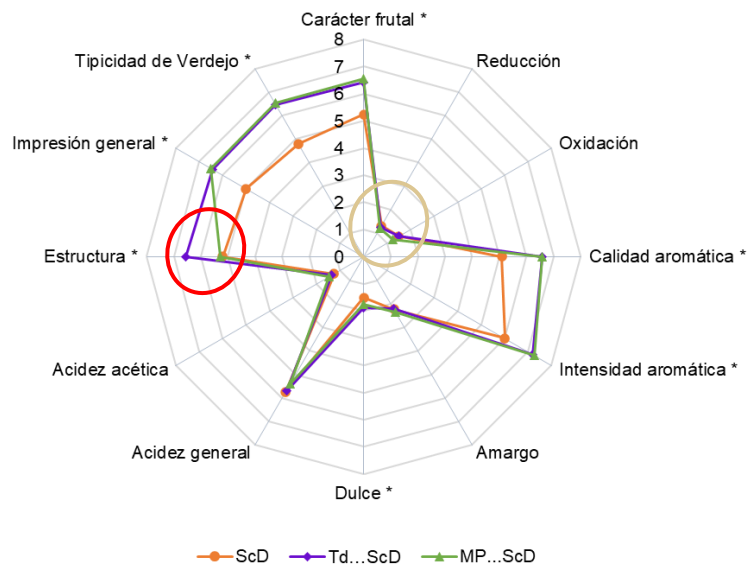


Ensayos en de fermentación (Secuencial y mixta) con *T. delbrueckii*+*S. cerevisiae*

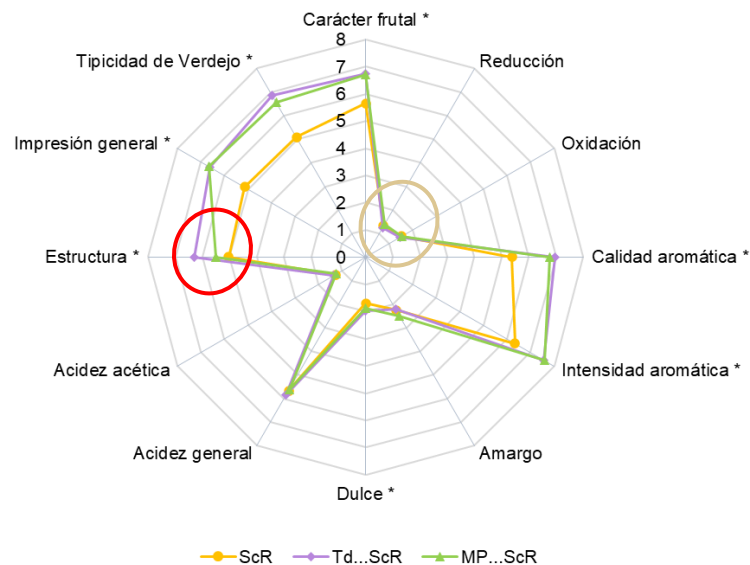


Análisis sensorial

Fermentaciones con Sc Diana



Fermentaciones con Sc Revelacion



Concentración de tioles



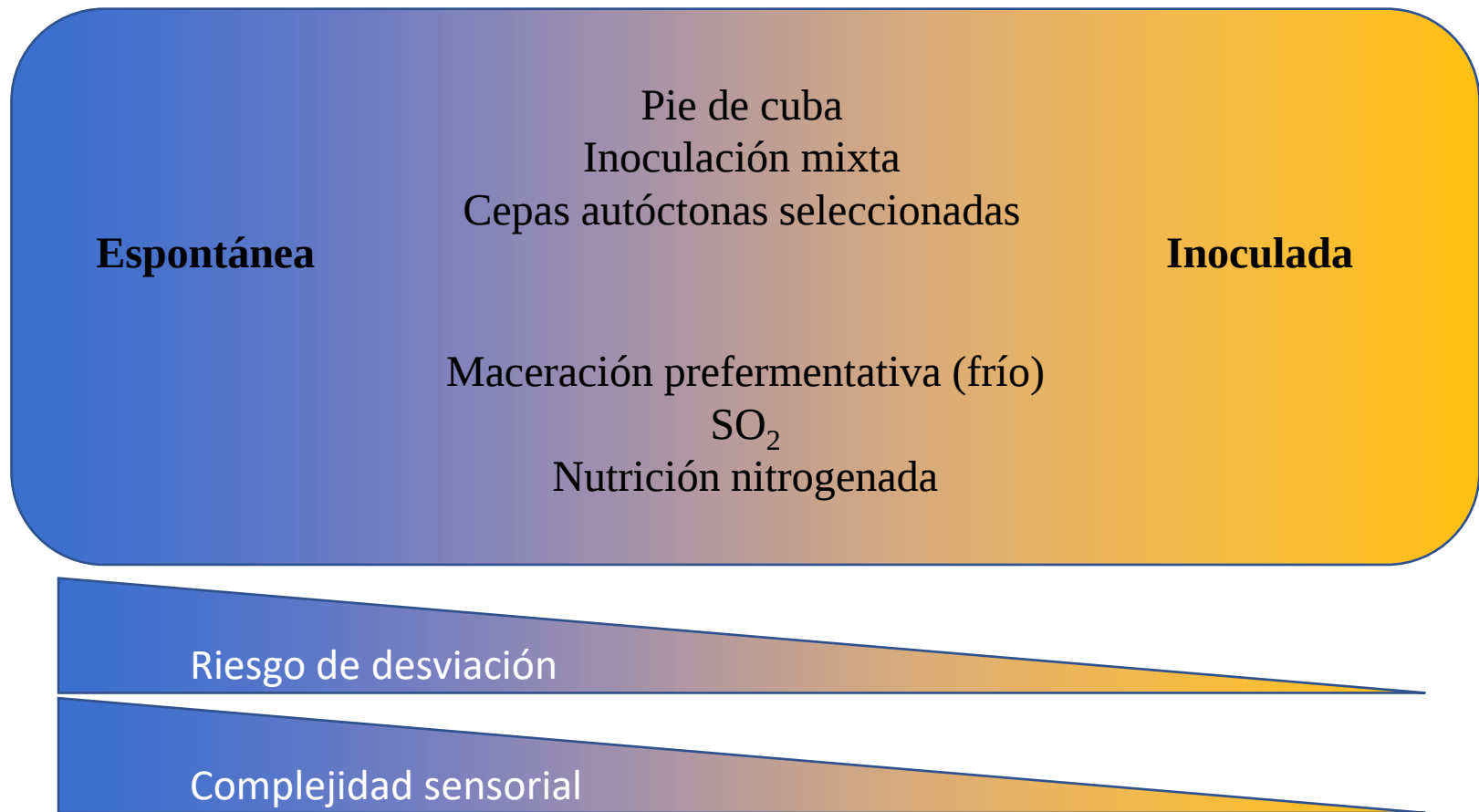
Concentración de aromas mayoritarios



Carácter frutal (Tipicidad Verdejo)



Estrategias para el manejo de la microbiota en fermentación



Retos asociados al cambio climático y las nuevas tendencias en elaboración

- emergencia de nuevos alterantes de la uva asociados al cambio climático
- manejo de la acidez de los vinos (impacto sensorial, pero también microbiológico)
- estabilidad microbiológica en vinos desalcoholizados



Microbial Interactions and Ecology



Gracias



Colaboraciones y Financiación



madriod



European Commission

Contacto: ignaciobelda@ucm.es / minelab.bioucm.es