

INFORME DE LOS ENSAYOS REALIZADOS – 27/03/2019

I. PARTICIPANTES

Empresa	Nombre	Función
CLEANWOOD	Bernardo Ausejo	CEO
	Alberto Pedrajo	Director Técnico
SBA	Charles Waffelaert	Técnico citometría
	Patrick Paulian	CEO

II. ORDEN DEL DÍA

- Presentación de la citometría y del citómetro Easycyte 5SL
- Presentación de Levia Test y TVO
 - Ensayo de recuento de levaduras viables
- Presentación de BrettanTest

III. OBJETIVOS DE NUESTRA PROPUESTA

El control de las poblaciones de levaduras en los vinos y mostos con el **CYTOMETRO de FLUJO MERK** y los **Test AMAROK** es un proceso de análisis:

- ❖ **PRECISO**, vemos todas las poblaciones presentes y su estado fisiológico
- ❖ **COMPLETO**, proporciona gráficos y datos
- ❖ **FÁCIL** de utilizar en su laboratorio
- ❖ Mucho más **RÁPIDO** que las demás técnicas de análisis
- ❖ **ECONÓMICO**, comparado con los análisis externos y otras técnicas
- ❖ **DISCRETO** y **CONFIDENCIAL**, hecho en su Bodega.

Permite obtener los **BENEFICIOS** siguientes:

- ❖ Un **control de la calidad** de sus pies de cuba y vinos en tiempo real
- ❖ La **detección segura** de los *Brettanomyces*
- ❖ El **seguimiento de los tratamientos** de erradicación de las *Brettanomyces*
- ❖ El **ahorro** de tratamientos preventivos o curativos
- ❖ Una **reducción drástica de los costes** de análisis que sean internos o externos

IV. CONSTACIONES GENERICAS

Estos test han sido realizados en muestras de laboratorio y bodega.

Se observa la **potencia y versatilidad de la citometría de flujo al control microbiológico** del vino. Esta técnica ofrecen un **conjunto de datos muy completo** con gráficos y ventanas que se pueden mover para seleccionar la información de la población que se quiera estudiar.

Comparado con otras técnicas, esta ofrece una graduación de la viabilidad, detallando si una levadura está activa o débil, o si tiene energía (ATP) para realizar las adaptaciones, multiplicaciones y metabolismos que necesita para sobrevivir o actuar.

Nuestros tests permiten

- ❖ Con el **Levia test**, un test rápido y económico, **análisis en rutina y verificar el estado microbiológico del vino**, y así evitar problemas de contaminación. En caso de obtener una población significativa, se verifica la **ausencia/presencia de *Brettanomyces*** mediante **Bretta test**.
- ❖ **Hacer un seguimiento de los vinos con poblaciones de levaduras**, verificar el efecto de los procesos y tratamientos en bodega. Todo en tiempo real, con un **coste mínimo** en la propia bodega.
- ❖ Control de embotellado y Esterilidad de procesos con el **TVO-Embotellado**, rápido, económico y fácil para
- ❖ **garantizar la calidad del vino en la botella**

V. INFORME DE LOS ENSAYOS EN CLEANWOOD

La empresa propuso el análisis una colección de 10 “aguas” antes y después del tratamiento por microondas de 7 barricas, para determinar su estado microbiológico.

Se analizaron 7 barricas:

- Antes de la desinfección
 - Levia test (Levaduras totales):
 - 3 muestras recogidas en solución acuosa (A1_{H2O}, etc.)
 - 7 muestras recogidas en solución hidroalcohólica (A1_{Alc}, etc.)
- Después de la desinfección:
 - Levia test:
 - 3 muestras recogidas en solución acuosa (A2_{H2O}, etc.)
 - 7 muestras recogidas en solución hidroalcohólica (A2_{Alc}, etc.)
 - TVO (10ml de solución en 20ml de medio boost incubado 24h)
 - 3 muestras recogidas en solución acuosa (A2_{H2O}, B2_{H2O}, C2_{H2O})
 - 2 muestras recogidas en solución hidroalcohólica (D2_{Alc}, E2_{Alc})
- 5 días después de la desinfección:
 - Levia test:
 - 3 muestras recogidas en solución acuosa (A2_{H2O}, etc.)
 - 7 muestras recogidas en solución hidroalcohólica (A2_{Alc}, etc.)

A. LEVIATEST Y TVO - TABLA RESUMEN DE LOS RESULTADOS

Muestras	Recuento de Levaduras (Udes por mL)				Constatación
	Viables	Débiles	Activas		
A1 _{H2O}	1.700	1.450	200	12%	
A2 _{H2O}	3.000	2.500	70	2%	Aumenta después del tratamiento
A2 _{H2O} TVO	3.000	zona levaduras			No hay multiplicación - No cultivable
A2 _{H2O} t=5días	3.000	2.100	64	2%	Población baja al cabo de unos días

Muestras	Recuento de Levaduras (Udes por mL)				Constatación
	Viables	Débiles	Activas		
A1 _{Alc}	450	350	60	13%	
A2 _{Alc}	2.800	2.000	400	14%	Aumenta después del tratamiento
A2 _{Alc} t=5días	1.000	600	250	25%	Población baja al cabo de unos días

Recuento de Levaduras (Udes por mL)					
Muestras	Viables	Débiles	Activas		Constatación
B1 _{H2O}	7.500	5.300	2.000	27%	
B2 _{H2O}	18.000	17.000	200	1%	Aumenta después del tratamiento
B2 _{H2O} TVO	7.750	Zona levaduras			Menos que muestra inicial No hay multiplicación – No cultivable
B2 _{H2O} t=5días	7.500	6.600	150	2%	Población baja al cabo de unos días

Recuento de Levaduras (Udes por mL)					
Muestras	Viables	Débiles	Activas		Constatación
B1 _{Alc}	5.500	2.300	3.200	58%	
B2 _{Alc}	20.000	18.000	1.000	5%	Aumenta después del tratamiento
B2 _{Alc} t=5días	5.000	3.500	1.200	24%	Población baja al cabo de unos días

Recuento de Levaduras (Udes por mL)					
Muestras	Viables	Débiles	Activas		Constatación
C1 _{H2O}	600	500	0	0	
C2 _{H2O}	1.700	800	5	0	Aumenta después del tratamiento
C2 _{H2O} TVO	132				No hay
C2 _{H2O} t=5días	250	200	0	0	Población baja al cabo de unos días

Recuento de Levaduras (Udes por mL)					
Muestras	Viables	Débiles	Activas		Constatación
C1 _{Alc}	3.800	2.500	1.000	26%	
C2 _{Alc}	4.500	3.200	200	4%	No varía después del tratamiento
C2 _{Alc} t=5días	600	450	40	7%	Población baja al cabo de unos días

Recuento de Levaduras (Udes por mL)					
Muestras	Viables	Débiles	Activas		Constatación
D1 _{Alc}	2.300	1.700	550	24%	
D2 _{Alc}	2.600	1.700	120	5%	Estable después del tratamiento
D2 _{Alc} TVO	726	Zona levaduras			Menos que muestra inicial No hay multiplicación – No cultivable
D2 _{Alc} t=5días	630	350	170	27%	Población baja al cabo de unos días

Recuento de Levaduras (Udes por mL)					
Muestras	Viables	Débiles	Activas		Constatación
E1 _{Alc}	4.900	2.900	1.500	31%	
E2 _{Alc}	96.000	75.000	5.000	5%	Aumenta después del tratamiento
E2 _{Alc} TVO	10.000	Zona levaduras			Menos que muestra inicial No hay multiplicación – No cultivable
E2 _{Alc} t=5días	15.000	12.000	2.000	13%	Población baja al cabo de unos días

Recuento de Levaduras (Udes por mL)					
Muestras	Viables	Débiles	Activas		Constatación
F1 _{Alc}	1.500	1.000	100	7%	
F2 _{Alc}	1.000	600	6	1%	No varía después del tratamiento
F2 _{Alc} t=5días	12.000	10.000	700	6%	Aumenta al cabo de unos días

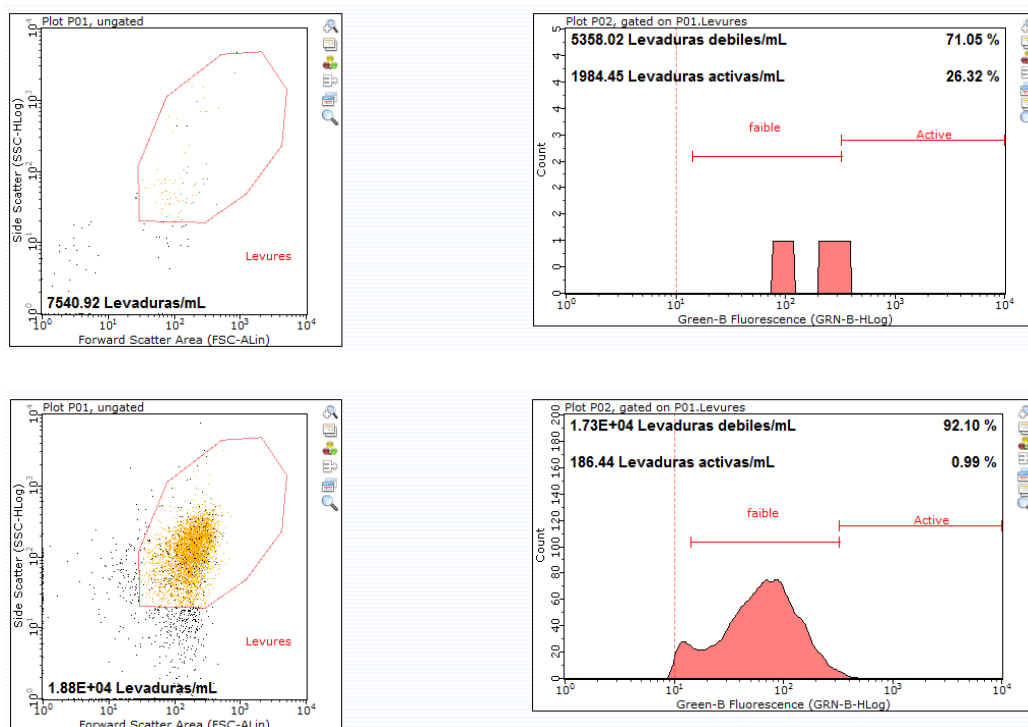
Recuento de Levaduras (Udes por mL)					
Muestras	Viables	Débiles	Activas		Constatación
G1 _{Alc}	500	400	40	8%	
G2 _{Alc}	79.000	70.000	2.200	3%	Aumenta después del tratamiento
G2 _{Alc} t=5días	2.500	2.000	25	1%	Población baja al cabo de unos días

B. LAS TENDENCIAS SON LAS SIGUIENTES – GRAFICAS DE VISUALIZACIÓN

Nota importante – no fijarse en las “superficies” y “números de eventos” de las poblaciones ya que esta visualización depende del factor de dilución que se ha elegido para las muestras, sino en los valores que sí se rectifican en función del factor.

1. El tratamiento libera levaduras presentes en la madera de la barrica
 - o la población de levaduras viables se incrementa de manera significativa (todas)

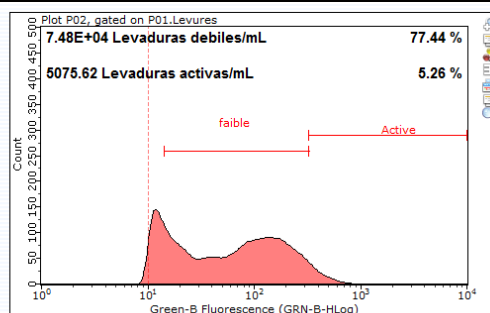
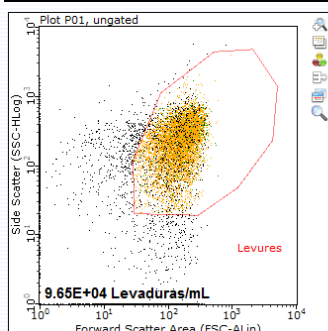
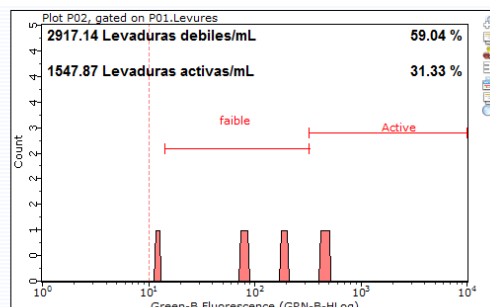
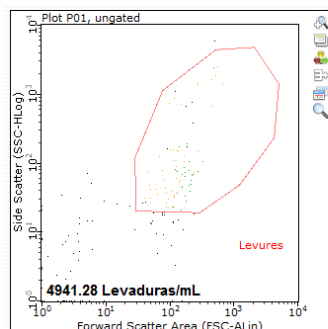
Ejemplo B1_{H2O}/B2_{H2O}



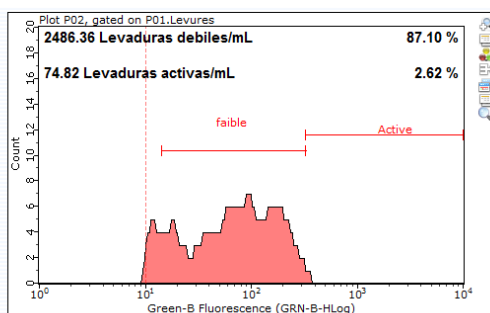
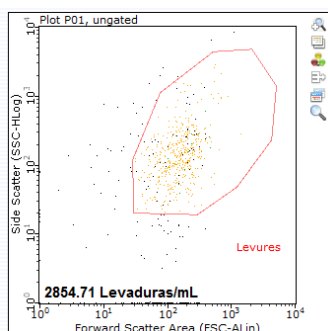
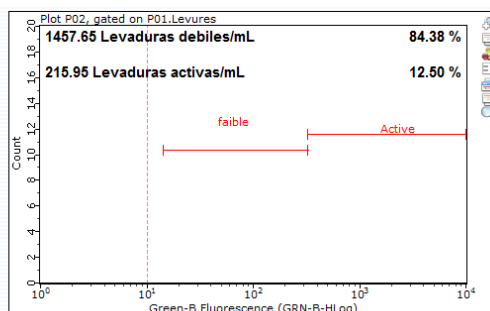
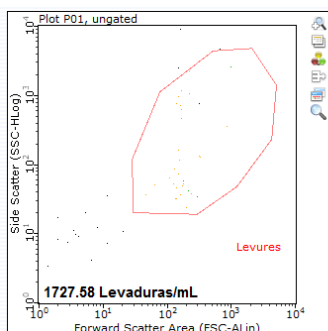
La población pasa de 7.500 levaduras antes del tratamiento a $1,9 \cdot 10^4$ levaduras después.

Esta tendencia se observa en todas las muestras.

Ejemplo E1_{A1c}/E2_{A1c}

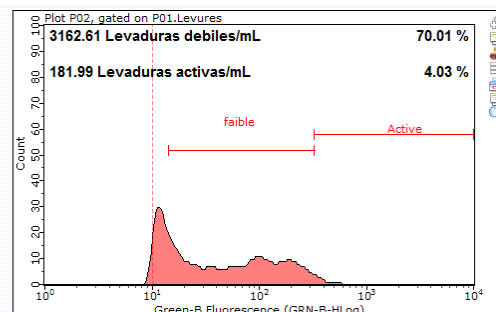
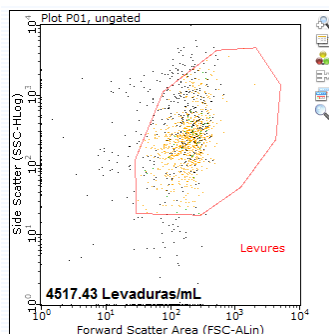
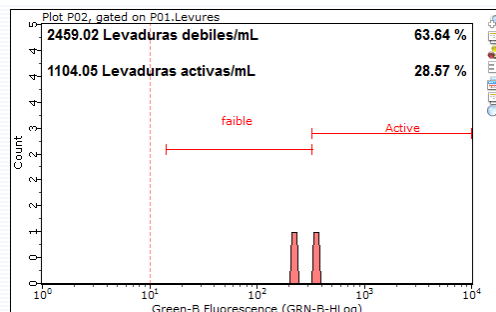
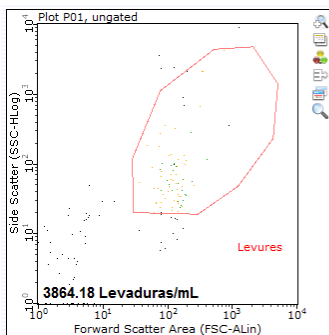


Ejemplo A1_{H2O}/A2_{H2O}



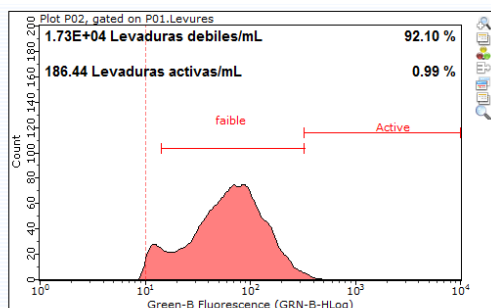
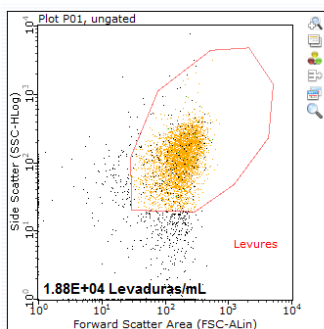
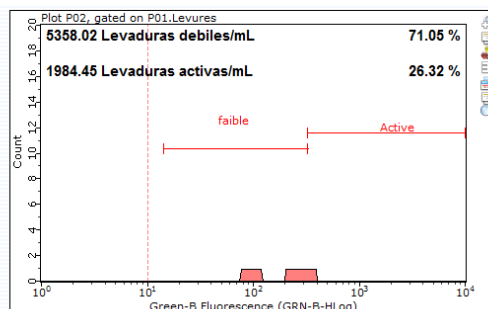
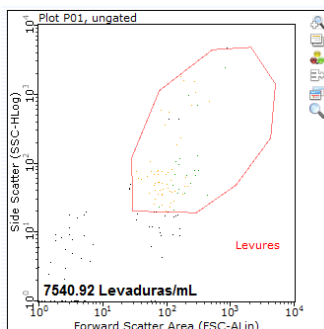
2. El tratamiento reduce la población de levaduras viables activas de manera inmediata
- en valor absoluto - si no se libera muchas levaduras (7 de 10)
 - en % - si se liberan muchas levaduras (9 de 10)

Ejemplo C1_{AIC}/C2_{AIC}



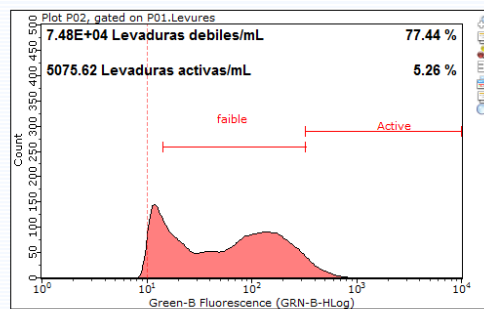
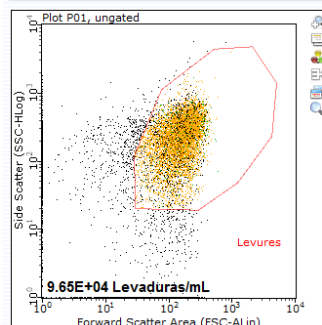
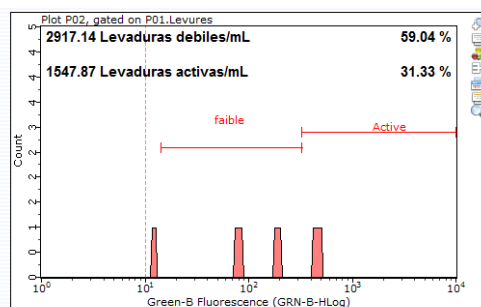
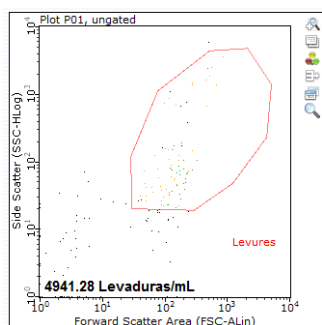
Se observan 1.100 levaduras activas antes del tratamiento y solo 200 después.

Ejemplo B1_{H2O}/B2_{H2O}



Aunque la población de levaduras pasa de 7.500 a 18.000, las levaduras activas pasan de 2.000 a 200.

Ejemplo E1_{Alc}/E2_{Alc}

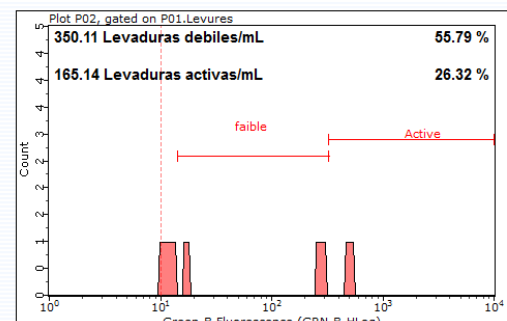
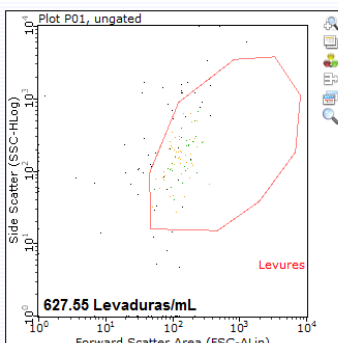
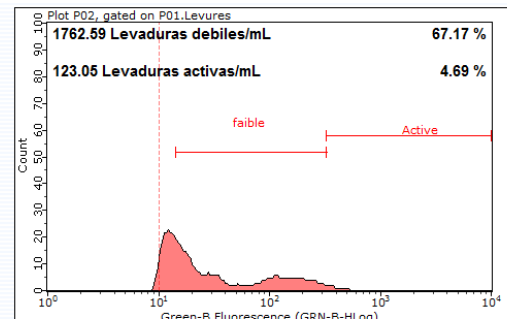
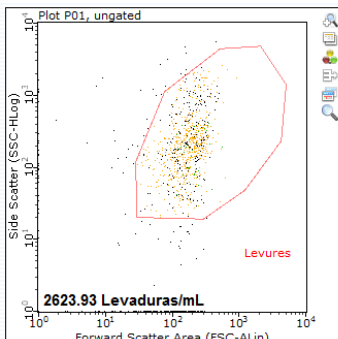
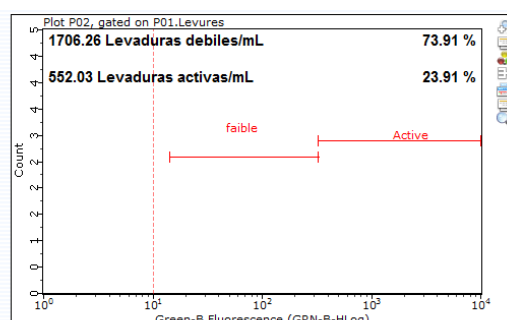
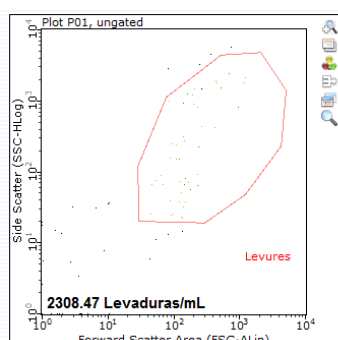


En este caso las levaduras activas pasan de 1500 a 5000, pero se mira el porcentaje, pasa de 30% a 5%.

3. El tratamiento merma la viabilidad de las levaduras - población inicial y población liberada

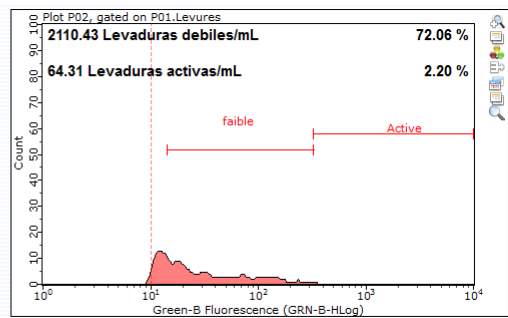
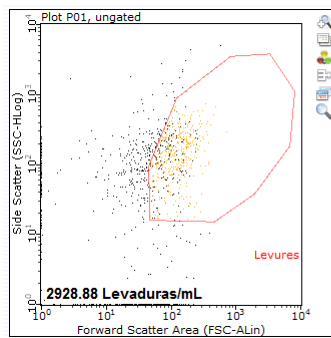
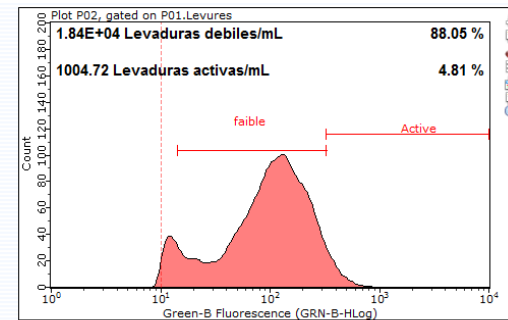
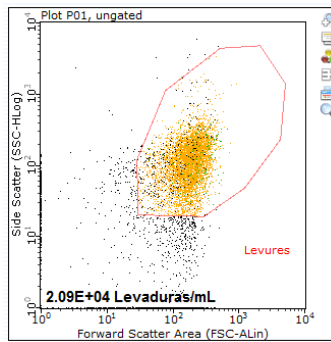
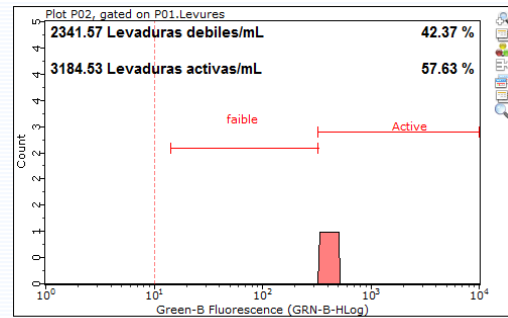
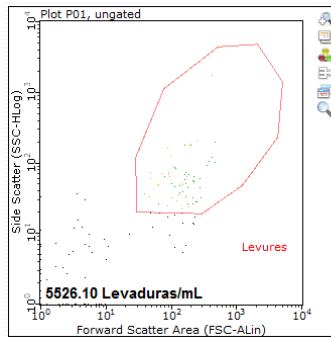
- o después de 5 días la población de levaduras viables disminuye de manera significativa (9 de 10, uno se mantiene igual)

Ejemplo D1_{A1c}/D2_{A1c}/D2_{A1c} 5 días



En este caso, al cabo de 5 días, solo quedan 600 levaduras de las 2.600 que había después del tratamiento.

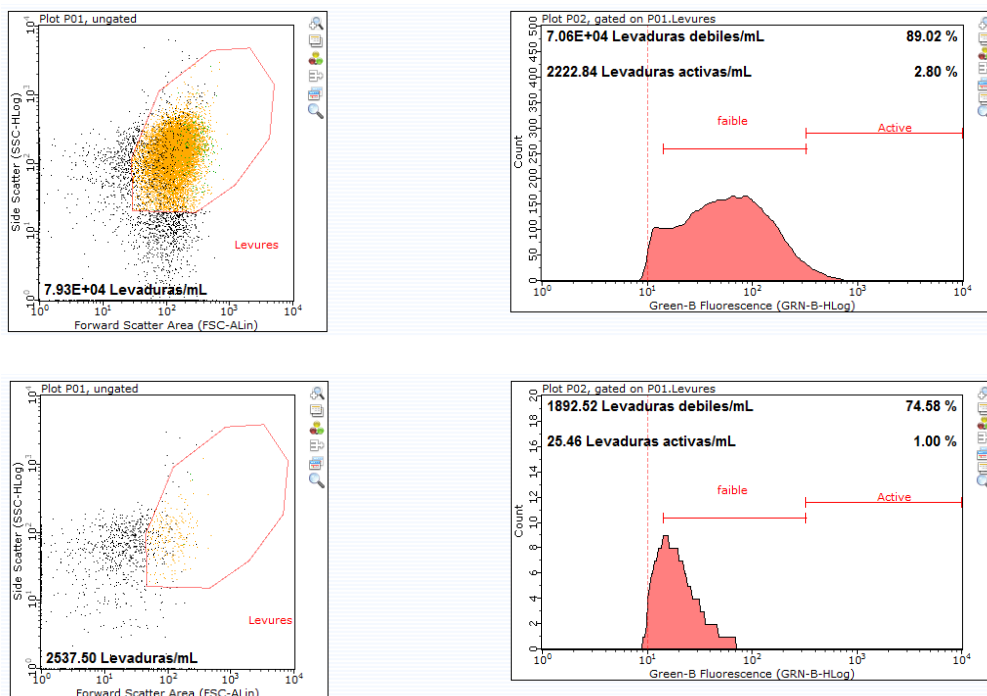
Ejemplo B1_{A1c}/B2_{A1c}/B2_{A1c} 5 días



En este caso, al cabo de 5 días, quedan 3.000 levaduras de las 21.000 que había después del tratamiento.

- Al cabo de 5 días, la estructura/tamaño disminuye (signo de desestabilización celular) (4 de 10)

Ejemplo G2_{AIC}/G2_{AIC} 5 días

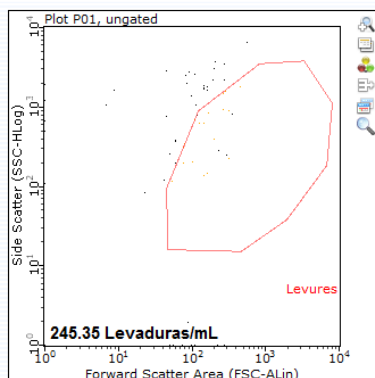
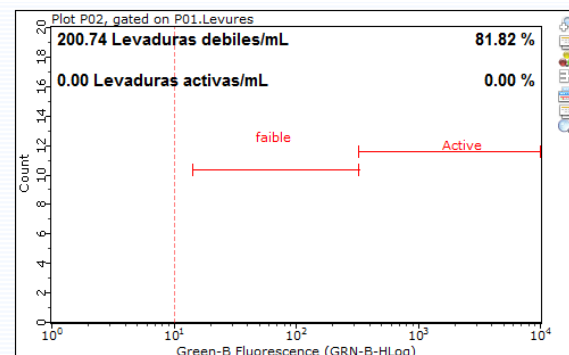
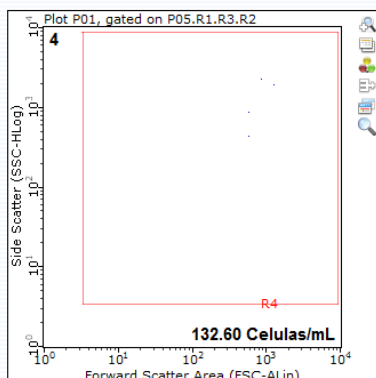
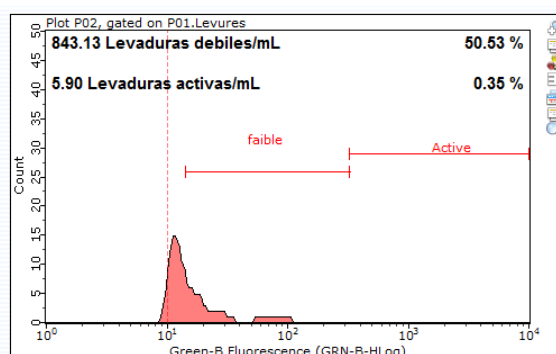
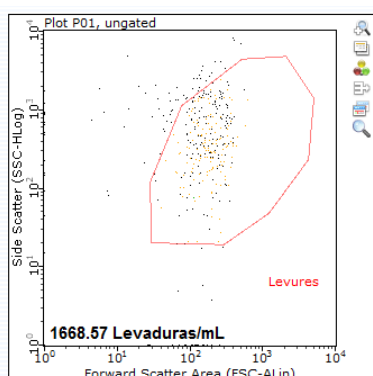


Se observa en algunos casos que al cabo de 5 días la estructura/tamaño de las levaduras disminuye. Esto sucede en levaduras en estado próximo a la muerte celular.

4. el TVO a 24H no "multiplica" las levaduras

- las levaduras viables no son "cultivables"
- 5 de 5 mantienen la misma concentración que LeviaTest al cabo de 5 días.

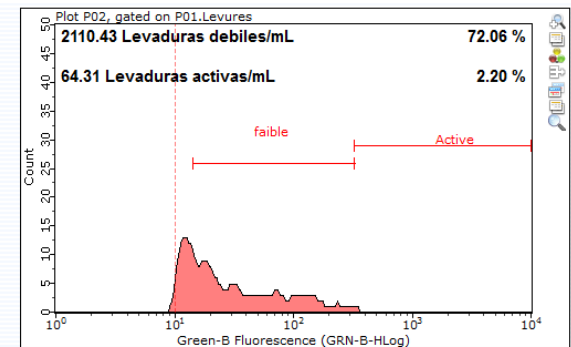
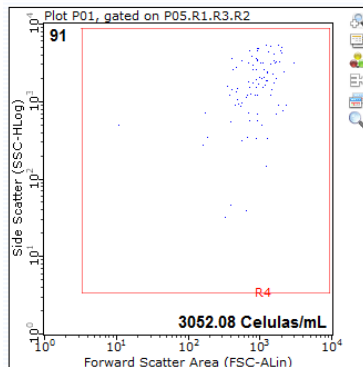
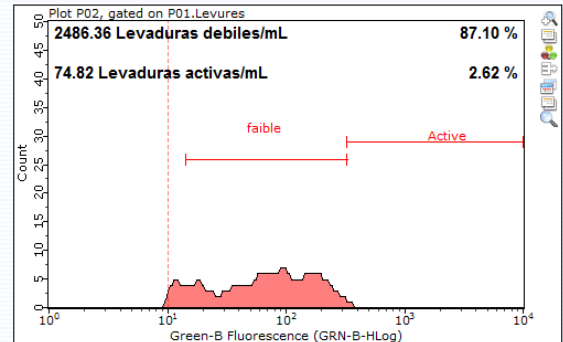
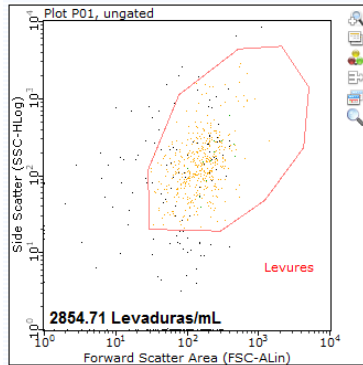
Ejemplo C₂H₂O/TVO/C₂H₂O 5 días



Las levaduras en el medio "boost" 24h NO se han multiplicado, sino que el número de levaduras viables ha disminuido.

Ha sucedido lo mismo con las levaduras después de 5 días.

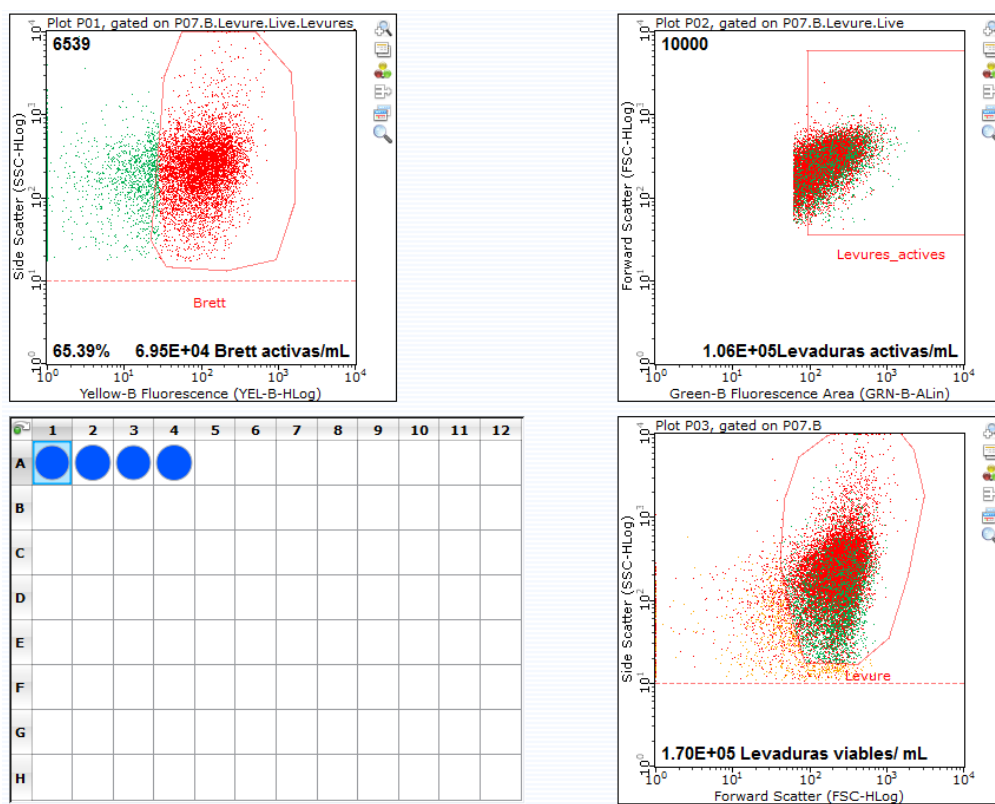
A2_{H2O}/TVO/A2_{H2O} 5 días



Las levaduras en el medio "Boost 24H" NO se han multiplicado.
Se obtiene el mismo resultado con TVO que con LeviaTest realizado al cabo de 5 días.

C. **BRETTATEST DE LAS MUESTRAS**

Muestra B1_{H2O} – BRETTA TEST

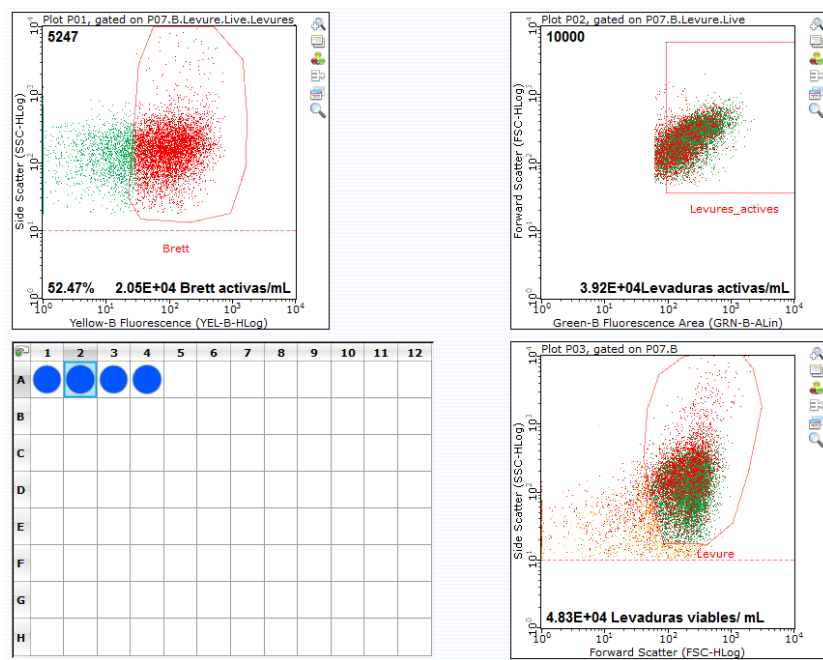


En esta muestra hay $1,7 \cdot 10^5$ Levaduras viables de las cuales 10^5 activas, de las cuales $7 \cdot 10^4$ sin Brett (65%)

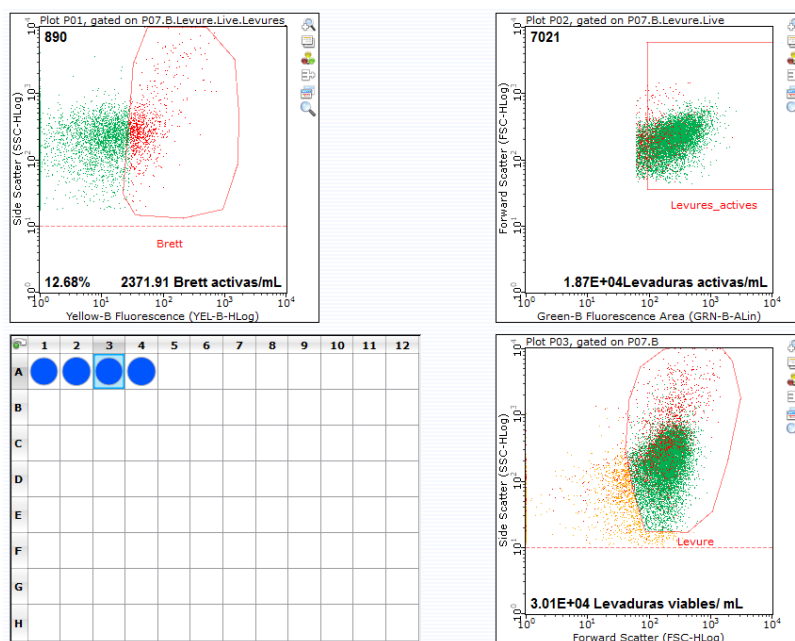
Se observa en esta muestra que hay una población no Brett y una población Brett.

BrettaTes es útil para determinar si la población estudiada es *Brettanomyces*.

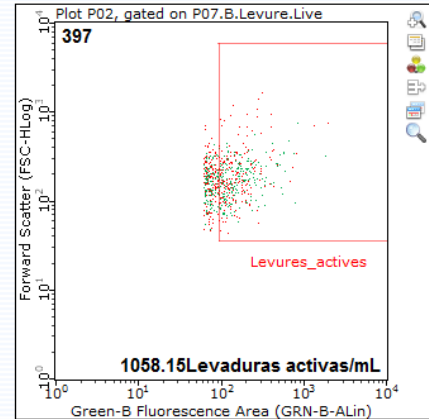
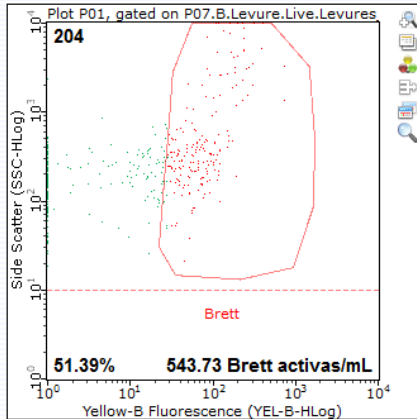
Muestra B1_{Alc} – BRETТА TEST



Muestra C1_{H2O} – BRETТА TEST



Muestra C1 Alc – BRETTA TEST



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	●								
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

