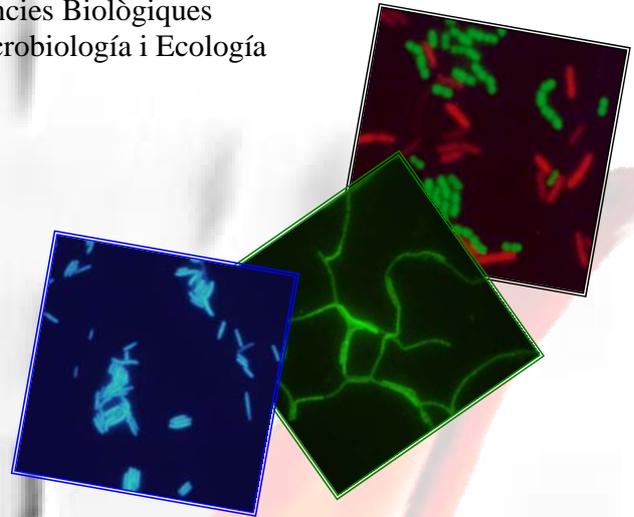


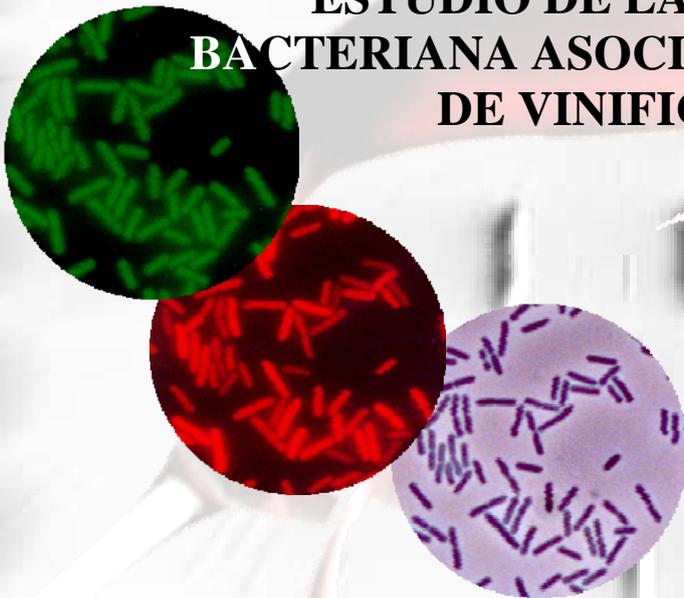


VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Universitat de València
Facultat de Ciències Biològiques
Departament de Microbiologia i Ecologia



**APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS FISH,
PCR ESPECÍFICA Y 16S-ARDRA AL
ESTUDIO DE LA POBLACIÓN
BACTERIANA ASOCIADA AL PROCESO
DE VINIFICACIÓN**



**LUCIA BLASCO ESCRIVÁ
VALENCIA 2009**

La presente tesis doctoral ha sido dirigida por la Dra. Isabel Pardo Cubillos y por el Dr. Sergi Ferrer Soler, Profesores Titulares del Departamento de Microbiología y Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia.

Burjassot, Mayo 2009

Fdo. Dra. Isabel Pardo Cubillos

Fdo. Dr. Sergi Ferrer Soler

Cuando se cierra una puerta se abre una ventana
Anónimo

Durante nuestra vida ocurren ciertos sucesos que van marcándonos, a veces buenos y otras no tanto. En ese camino que recorremos encontramos a personas que nos apoyan, nos dan su cariño, nos hacen reír, o llorar, muy buenos amigos que nunca olvidaremos y otros que simplemente pasan de largo. A todos aquellos con los que he compartido durante mi recorrido algunos momentos quiero agradecerles de todo corazón su apoyo, su compañía, sus consejos y el haberme escuchado cuando más lo necesitaba.

Me gustaría agradecer a mis directores de Tesis, Isabel Pardo y Sergi Ferrer el haberme dado la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su grupo de investigación y por el apoyo mostrado durante todo el periodo de realización de la Tesis.

Abreviaturas:

<i>A.</i>	<i>Acetobacter</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin 5' trifosfato
BSA	Seroalbúmina bovina
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
ucf	Unidades formadoras de colonias
DSMZ	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
D.O.	Denominación de origen
dNTP	Deoxinucleotido trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
<i>et al.</i>	<i>et altri</i>
FA	Fermentación alcohólica
FML	Fermentación maloláctica
<i>G.</i>	<i>Gluconobacter</i>
<i>Ga.</i>	<i>Gluconacetobacter</i>
Kb	Kilobases
<i>L.</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
min	Minutos
MLO	Medio para <i>Oenococcus oeni</i>
NCFB	National Collection of Food Bacteria c/o NCIMB
<i>O.</i>	<i>Oenococcus</i>
<i>P.</i>	<i>Pediococcus</i>
p/v	Relación de peso por volumen
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain reaction
pH	$-\log [H^+]$

PM	Peso Molecular
ppm	Partes por millón
PVP	polivinilpirrolidona
PVPP	polivinilpolipirrolidona
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
s	Segundos
SO ₂	Anhídrido sulfuroso
T _m	Melting temperature (Temperatura de fusión)
Tris	Tris hidroximetil aminometano
UV	Ultravioleta
v/v	Relación volumen por volumen

	Pág.
1. Introducción	1
1.1 Ecología de las bacterias lácticas y acéticas asociadas al proceso de vinificación	4
1.2 Actividades beneficiosas y perjudiciales de bacterias lácticas y acéticas en mostos	7
1.2.1 Efectos beneficiosos de las bacterias lácticas: Fermentación maloláctica	7
1.2.2 Efectos perjudiciales de las bacterias lácticas	8
1.2.3 Efectos perjudiciales de las bacterias acéticas	11
1.3 Posición taxonómica de bacterias lácticas	14
1.4 Posición taxonómica de bacterias acéticas	18
1.5 Métodos de identificación, tipificación y detección de bacterias del vino	21
1.5.1 Bacterias lácticas	21
1.5.2 Bacterias acéticas	24
2. Objetivos	27
3. Material y Métodos	31
3.1 Microorganismos, medios de cultivo y de aislamiento, condiciones de crecimiento generales y condiciones de conservación	33
3.1.1 Bacterias lácticas	33
3.1.2 Bacterias acéticas	35
3.2 Desarrollo de las técnicas de hibridación <i>in situ</i>	37
3.2.1 Diseño de sondas	37
3.2.2 Fijación de las células a partir de cultivo puro, muestras de mosto o vino	38
3.2.3 Hibridación en porta	39

3.2.3.1	Gelatinización de portas	39
3.2.3.2	Aplicación de las muestras y permeabilización	39
3.2.3.3	Hibridación con una o múltiples sondas y montaje	40
3.2.4	Hibridación en filtro	41
3.2.4.1	Aplicación de las muestras y permeabilización	41
3.2.4.2	Hibridación y montaje	41
3.2.5	Visualización al microscopio	42
3.2.6	Estimación de la pérdida de células durante la hibridación	43
3.3	Análisis de fragmentos de restricción del fragmento amplificado del gen ribosomal 16S: 16S-ARDRA	44
3.4	Desarrollo de cebadores específicos para identificación/detección del género <i>Acetobacter</i> y de algunas de sus especies	45
3.4.1	Detección de bacterias acéticas en vino mediante PCR específica	46
3.5	Secuenciación del gen 16S rADN	52
3.6	Estimación de la viabilidad de las células en las muestras	53
3.7	Aplicación de las técnicas desarrolladas para el seguimiento de bacterias lácticas y acéticas en muestras naturales	54
3.7.1	Estudio de la evolución de las población de BA durante una vinificación industrial	54
3.7.2	Estudio de la dinámica de poblaciones de BL y BA en vinificaciones piloto	56
3.7.3	Estudio de la evolución de las poblaciones de BL y BA en vinificaciones de laboratorio para evaluar el efecto del SO ₂ sobre las mismas	59
4.	Resultados y discusión	61

4.1. FISH (Fluorescent <i>in situ</i> hybridization)	63
4.1.1 Diseño de sondas	63
4.1.2 Optimización de las condiciones de permeabilización e hibridación	64
4.1.3 Especificidad de las sondas	67
4.1.4 Comparación de los resultados de FISH en porta y filtro y evaluación de la pérdida de células	74
4.2 Análisis del 16S-ARDRA	76
4.3 PCR específica para la detección de BA	84
4.4 Comparación de los resultados obtenidos con FISH, 16S-ARDRA y PCR específica	90
4.5 Aplicación de las técnicas de FISH, 16S-ARDRA y PCR específica	93
4.5.1 Estudio de la evolución de la población de BA durante una vinificación industrial	93
4.5.2 Estudio de la dinámica de poblaciones de BL y BA en vinificaciones piloto	104
4.5.3 Estudio de la evolución de las poblaciones de BL y BA en vinificaciones de laboratorio con distintas concentraciones de SO ₂	112
5. Discusión general	123
6. Conclusiones	129
7. Bibliografía	133
8. Anexo	157

1. Introducción

La vinificación es un proceso biotecnológico de origen ancestral. El vino es un alimento alcohólico obtenido tras la fermentación del mosto de uvas por las levaduras. Aunque esencialmente son las levaduras las que desarrollan el papel principal en la fermentación también se encuentran implicados muchos otros microorganismos, entre los que destacan las bacterias lácticas (BL), responsables de la fermentación maloláctica (FML) y de algunas alteraciones (Davis *et al.*, 1988; Lonvaud-Funel, 1999), y las bacterias acéticas (BA) responsables fundamentalmente del picado acético.

Las proporciones relativas de las especies que integran la microbiota presente en la superficie de la uva se ven afectadas por un gran número de factores. Entre estos factores se incluyen influencias climáticas como la temperatura y la pluviosidad (Longo *et al.*, 1991; Querol y Barrio, 1990; Querol *et al.*, 1990), el grado de madurez de la cosecha, (Martínez *et al.*, 1989; Rosini *et al.*, 1982), el uso de fungicidas (Bureau *et al.*, 1982), el estado sanitario de los frutos (Longo *et al.*, 1991) y, en menor proporción, la variedad de uva (Lafon-Lafourcade, 1983). El origen de los microorganismos del vino está en la materia prima, en la maquinaria de bodega (prensas, tanques, depósitos, bombas, etc.) y en la utilización de cultivos iniciadores (Bureau *et al.*, 1982; Fleet, 1993; Kunkee y Goswell, 1977; Lafon-Lafourcade, 1983; Longo *et al.*, 1991; Martínez *et al.*, 1989; Querol *et al.*, 1990; Sapis-Domercq *et al.*, 1977). La microbiota presente en la materia prima se halla en la pruina (capa cética) del fruto y está compuesta por levaduras, hongos filamentosos y bacterias.

La composición química final del vino depende de la materia prima de la que procede, de las transformaciones de los componentes del mosto que llevan a cabo los microorganismos, y de las modificaciones químicas y bioquímicas que se producen durante la elaboración y crianza. Debido al elevado número de variables que afectan en la producción del vino podemos encontrar una amplia gama de vinos distribuidos por todo el mundo.

1.1 Ecología de las bacterias lácticas y acéticas asociadas al proceso de vinificación

Las BL se encuentran en baja proporción en uvas sanas (menos de 100 células por gramo de fruto) (Fleet, 1993; Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983). Las especies de BL aisladas de mosto son principalmente *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, y en menor proporción *Lactobacillus bobalius*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus uvarum* y *Leuconostoc paramesenteroides* (syn. *Weissella paramesenteroides*) (Chalfan *et al.*, 1977; Mañes *et al.*, 2008a, Mañes *et al.*, 2008b, Pardo y Zúñiga, 1992; Rodas *et al.*, 2003; Rodas *et al.*, 2005). Las BL son responsables de la FML, un proceso de desacidificación beneficioso para vinos muy ácidos, pero también pueden dar lugar a alteraciones que deprecian la calidad del vino.

Las BL suelen hallarse en una concentración del orden de 10^2 - 10^4 ufc mL⁻¹ en los mostos recién estrujados. A lo largo de la fermentación la concentración de las BL disminuye como consecuencia de tres fenómenos: la competencia con levaduras, y su sensibilidad al SO₂ y al etanol. Generalmente, tras la fermentación alcohólica (FA) el número de BL aumenta hasta 10^7 - 10^8 ufc mL⁻¹ y, como consecuencia, se produce la FML. Varios autores han demostrado que en mostos recién estrujados y durante los primeros momentos de la FA se encuentran especies de lactobacilos homofermentadores y heterofermentadores facultativos, tales como *Lactobacillus mali*, *L. plantarum* o *Lactobacillus casei* (Costello *et al.*, 1983; Davis *et al.*, 1986a), así como especies de metabolismo heterofermentador estricto como *L. brevis*, y *Leuconostoc dextranicum* (actualmente *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum*) (Chalfan *et al.*, 1977; Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983). Conforme la fermentación progresa, los lactobacilos homofermentadores van cediendo paso a especies de lactobacilos heterofermentadores estrictos, tales como *L. brevis*, *L. hilgardii*, *Lactobacillus fructivorans* (syn. *L. trichodes*), *Lactobacillus fermentum* (syn. *L. cellobiosus*) y a cocos, tales como *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus pentosaceus* y *Oenococcus oeni* (Davis *et al.*, 1986a, Pardo y Zúñiga, 1992; Pan *et al.*, 1982). Sin embargo, también se han aislado especies heterofermentadoras facultativas (*L. plantarum* y *Pediococcus* spp.) al final de la FA o en vinos acabados, en los que incluso han llegado a realizar la

FML (Chalfan *et al.*, 1977; Costello *et al.*, 1983; Davis *et al.*, 1986a; Davis *et al.*, 1986b; Pan *et al.*, 1982). Recientemente se han descrito nuevas especies del género *Lactobacillus* asociadas a la vinificación *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus kunkeei*, *Lactobacillus bobalius* *Lactobacillus vini* y *Lactobacillus uvarum* (Edwards *et al.*, 2000; Edwards *et al.*, 1998; Rodas *et al.*, 2006, Mañes *et al.*, 2008a; Mañes *et al.*, 2008b).

Las BA se pueden encontrar en elevadas concentraciones en mostos, sobre todo si estos provienen de uvas en mal estado o rotas, y los microorganismos que se suelen aislar pertenecen a las especies *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* y *Gluconobacter oxydans* (Drysdale y Fleet, 1988; Lafon-Lafourcade y Joyeux, 1981).

Aunque el ácido acético puede ser producido por hongos filamentosos, levaduras y BL, las principales responsables del picado acético son las BA. Las BA están muy difundidas en la naturaleza: se aíslan a partir de las uvas maduras, suelos y bebidas alcohólicas fermentadas. El 30% de los mostos al comienzo de la FA las contienen (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1980). La concentración de BA en mostos procedentes de uvas sanas es de 10^2 - 10^3 ufc mL⁻¹, mientras que en los que proceden de uvas dañadas o infectadas es de 10^6 ufc mL⁻¹. La especie aislada mayoritariamente en mosto de uvas sanas suele ser *G. oxydans*, (Splittoesser y Churney, 1992; Sponholz, 1993), mientras que en uvas en mal estado se han encontrado también las especies *A. aceti* y *A. pasteurianus*. La presencia de *G. oxydans* únicamente en estadios tempranos de la fermentación puede explicarse por su baja tolerancia al etanol (De Ley *et al.*, 1984b). A mitad de fermentación se encuentran *A. aceti* y *Gluconacetobacter liquefaciens*, especialmente cuando la cantidad de SO₂ es baja. En fermentaciones en las que se ha adicionado SO₂ *A. pasteurianus* es la especie dominante y suele predominar hacia el fin de la fermentación, debido a su mayor tolerancia al etanol (De Ley *et al.*, 1984b). Otros autores han descrito también la presencia de *Gluconacetobacter hansenii* durante la FA (Du Toit y Lambrechts, 2002; González *et al.*, 2004). La evolución de BA puede diferir en distintas vinificaciones, así en vinos franceses y australianos *A. aceti* y *A. pasteurianus* son las especies dominantes a lo largo de toda la vinificación (Drysdale y Fleet, 1985; Joyeux *et al.*, 1994). Al final de la FA y por efecto de los trasiegos la población de BA aumenta hasta 10^6 ufc mL⁻¹ y la especie mayoritariamente aislada es *A. aceti*. Las condiciones de microaerofilia que se dan en las barricas permiten la

supervivencia e incluso el crecimiento de las BA en vinos durante la crianza. Una población de 100 células es suficiente para alterar el vino conservado en barricas, solamente con el aire que penetra a través de la madera (Joyeux *et al.*, 1983; Ribéreau-Gayon, 1985). La propiedad de mantenerse viables en condiciones de anaerobiosis explicaría la supervivencia y lento crecimiento de estos microorganismos en el vino almacenado bajo condiciones aparentemente anaeróbicas (Drysdale y Fleet, 1985; Joyeux *et al.*, 1983). Esto es un nuevo concepto para la enología, que hasta ahora había asumido que las BA eran estrictamente aerobias, y que sólo se podían desarrollar en aquellas barricas que no estaban llenas en su totalidad (Bartowsky *et al.*, 2003). Durante la crianza de vinos españoles la única especie que se ha aislado es *A. aceti*, sin embargo, en la de los vinos de Burdeos aunque la mayoritaria es esta especie, también se ha aislado *A. pasteurianus* (González *et al.*, 2004; Guillamón *et al.*, 2003; Joyeux *et al.*, 1984). En vinos australianos y surafricanos la especie predominante es *A. pasteurianus*, aunque en los últimos se ha aislado también *Ga. liquefaciens* en proporción inferior (Drysdale y Fleet, 1985; Joyeux *et al.*, 1994). Recientemente se ha descrito una nueva especie perteneciente al género *Acetobacter*, *Acetobacter oeni*, en vinos tintos alterados de la región de Dão en Portugal (Silva *et al.*, 2006).

Como se puede deducir de lo dicho, el mosto no es estéril, y normalmente no se practican operaciones que garanticen la eliminación total de microorganismos. Sin embargo, factores tales como la progresiva anaerobiosis del medio provocada por la FA, la acción selectiva del SO₂ y el aumento de la concentración de etanol van a condicionar la evolución de las poblaciones microbianas. Así, desaparecerán progresivamente los microorganismos aerobios por las condiciones de anaerobiosis que se crean, y los más sensibles al SO₂ y al etanol.

1.2 Actividades beneficiosas y perjudiciales de bacterias lácticas y acéticas en mostos y vinos

Las BL pueden ser beneficiosas o perjudiciales en el vino, en función de la especie o cepa de la que se trate, del momento en el que se desarrollen y de los sustratos del vino a los que ataquen. En cambio, el desarrollo de BA siempre está relacionado con alteraciones.

1.2.1 Efectos beneficiosos de las bacterias lácticas: Fermentación maloláctica

La FML es un proceso llevado a cabo por las BL en los vinos, generalmente una vez concluida la FA. Consiste en la transformación del ácido málico presente en el vino en ácido láctico y CO₂. Esta reacción está catalizada por el enzima maloláctico y requiere de la presencia de NAD⁺ y de Mn⁺². El enzima maloláctico está presente en todas las bacterias asociadas al proceso de vinificación (Sponholz, 1993).

La transformación del ácido málico en láctico es de gran interés para mejorar el gusto de aquellos vinos que tienen una excesiva acidez total, ya que se rebaja la acidez, aumenta el pH, mejora el gusto, y proporciona mayor estabilidad microbiológica al vino, al desaparecer un sustrato que puede ser utilizado por las bacterias para su crecimiento (Bousbouras y Kunkee, 1971; Costello *et al.*, 1985; Davis *et al.*, 1985).

La modificación de otros compuestos que intervienen en el perfil organoléptico de los vinos no es consecuencia directa de la FML sino de la utilización de otros sustratos por las bacterias durante su crecimiento en el mosto o el vino; así por ejemplo, el ácido cítrico da lugar a diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2000). Estas modificaciones pueden mejorar las características del vino, siempre que sus valores se encuentren dentro de unos márgenes aceptables (Amerine *et al.*, 1982; Davis *et al.*, 1986b).

Sin embargo, la FML no siempre tiene efectos positivos, ya que cuando tiene lugar en vinos de baja acidez da lugar a sabores muy planos. Además, la subida de pH puede provocar una pérdida de color y aumenta el riesgo de desarrollo de especies microbianas perjudiciales. (Davis *et al.*, 1985).

1.2.2 Efectos perjudiciales de las bacterias lácticas

Los azúcares son la principal fuente de carbono y energía para las BL y son catabolizados por la vía fermentativa. En el mosto de uva se encuentran principalmente glucosa y fructosa y también pequeñas cantidades de disacáridos y pentosas (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Las BL pueden exhibir dos tipos de metabolismo respecto a las hexosas: homofermentativo y heterofermentativo: El metabolismo homofermentativo se caracteriza porque las hexosas son fermentadas vía Embden-Meyerhof, dando lugar exclusivamente a ácido láctico. El metabolismo heterofermentativo supone el catabolismo de las hexosas mediante la vía del 6-fosfogluconato, dando lugar a CO₂, etanol o ácido acético, y ácido láctico, en cantidades equimoleculares (Lonvaud-Funel, 1999; García *et al.*, 1992).

Cuando las BL se desarrollan en mosto o en vino donde quedan azúcares ocurre una alteración denominada **acidificación, o picado láctico** que se caracteriza por un incremento significativo de la concentración de ácido láctico y, en algunos casos también de ácido acético.

Si las BL heterofermentativas se desarrollan en mostos o en vinos conteniendo elevadas cantidades de fructosa residual se produce manitol, a este proceso se le denomina fermentación manítica (Sponholz, 1993; Suárez e Iñigo, 1990). La presencia de manitol proporciona un gusto agridulce y a esta alteración se le denomina **vuelta manítica**.

Las BL también pueden transformar los ácidos orgánicos presentes en el mosto o en el vino. Los principales ácidos orgánicos presentes en mostos son el tartárico (2-6 g L⁻¹), el málico (1-6.5 g L⁻¹), el cítrico (0.5-1 g L⁻¹) y el ascórbico y el glucónico en cantidades inferiores a las anteriores (Flanzy, 2000). Como consecuencia de la actividad microbiana durante la fermentación de los mostos, otros ácidos pueden aparecer como el pirúvico, L o D-láctico, succínico, acético, citramálico, oxalacético y fumárico.

El ácido tartárico es el ácido más abundante en el vino, existen pocas especies de BL capaces de degradarlo y todas ellas se encuentran dentro del género *Lactobacillus* (Radler y Yannissis, 1972). La capacidad de degradar este ácido es dependiente de cepa (Pardo, 1987; Radler y Yannissis, 1972). La ruta de degradación de este ácido difiere

según la especie, así en *L. plantarum* los productos finales son ácido láctico, acético y CO₂, mientras que en *L. brevis* se produce ácido succínico, acético y CO₂. Como consecuencia de la degradación del ácido tartárico se produce aumento de la acidez fija y de la acidez volátil del vino y a esta alteración se la denomina **vuelta tartárica**.

Otro ácido que puede ser atacado por las BL es el ácido cítrico, que se escinde en una molécula de oxalacetato y otra de acetato mediante la citrato liasa. El oxalacetato da lugar a piruvato, que es fuente de compuestos acetoínicos tales como: diacetilo, acetoina y 2, 3-butanodiol. El diacetilo es un compuesto que en bajas cantidades (3-4 mg L⁻¹) es beneficioso en el aroma de los vinos. Sin embargo, cuando excede estas concentraciones provoca un indeseable sabor a mantequilla o a suero de leche en los vinos.

La presencia de ácido sórbico en el vino es consecuencia de su adición por el hombre como antimicrobiano. Algunas BL son capaces de reducirlo hasta sorbinol, lo que confiere al vino un olor semejante al que se produce el cortar las hojas del geranio. La presencia del sorbinol es detectable a muy bajas concentraciones (0.1 µg L⁻¹), de ahí su peligrosidad. Edinger y Splittoesser (1986) confirmaron que *O. oeni* podía realizar esta reducción y demostraron que las cepas de *Pediococcus* y *Lactobacillus* no podían llevarla a cabo.

Otros sustratos susceptibles de ser utilizados por las BL son los aminoácidos, que están presentes en el mosto o en el vino, y pueden dar lugar a aminas biógenas o a precursores del carbamato de etilo, ambos productos considerados peligrosos para la salud humana. Las aminas biógenas son indeseables en todos los alimentos y bebidas porque absorbidas en alta concentración pueden producir dolores de cabeza, alteraciones respiratorias, palpitaciones cardíacas, hiper o hipotensión y fenómenos de alergia. Por su parte, el carbamato de etilo es considerado como potencial cancerígeno. Durante la FML las BL varían significativamente el contenido en compuestos nitrogenados del vino (Van Vuuren y Dicks, 1993). La descarboxilación de algunos aminoácidos presentes en el vino, como la histidina y la tirosina, puede dar lugar a la producción de aminas biógenas tales como histamina y tiramina respectivamente (Vidal-Carou *et al.*, 1990b). La más peligrosa por sus efectos en el hombre es la histamina, aunque las otras pueden potenciar su efecto (Vidal-Carou *et al.*, 1990a). La formación de aminas biógenas ha sido descrita en especies tales como *P. parvulus*

(Landete *et al.*, 2005), *O. oeni* (Guerrini *et al.*, 2002; Lonvaud-Funel y Joyeux, 1994) *L. hilgardii* (Fariás *et al.*, 1993), *L. brevis* (Landete *et al.*, 2005), *L. mali* (Landete *et al.*, 2005) y *L. plantarum* (Arena *et al.* 2007). Estos compuestos se producen más frecuentemente y en mayor cantidad en vinos de pH alto y concentraciones de SO₂ bajas (García *et al.*, 1992; Landete *et al.*, 2005; Vidal-Carou *et al.*, 1990b). El etil carbamato es un carcinógeno encontrado en muchos alimentos y bebidas fermentados, incluido el vino (Ough y Amerine, 1976). Se forma como consecuencia de la reacción química del etanol con algún precursor del etil carbamato tales como la citrulina, urea o carbamil fosfato, formados durante el catabolismo de la arginina por parte de levaduras o BL (Ough y Amerine, 1988). Aunque los niveles de citrulina en el vino son bajos, pueden traducirse en concentraciones de carbamato de etilo superiores a 15 ng L⁻¹, que es el límite voluntariamente establecido en vinos para este compuesto (Liu *et al.*, 1994; Pardo, 2003). Liu *et al.*, (1994), demostraron que existía una buena correlación entre la degradación de arginina, la producción de citrulina y la formación de etil carbamato durante la FML realizada con una cepa de *O. oeni* en un vino de laboratorio (Romero *et al.*, 2009).

Algunas BL de los géneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* pueden producir polisacáridos a partir de los azúcares. La presencia de estos polisacáridos en vino cambia sus propiedades reológicas dándole un aspecto viscoso u oleoso (alteración denominada **ahilado o grasa**). La alteración puede ocurrir en los tanques al final de la FML pero la mayoría de los problemas se producen en vinos embotellados. Este tipo de vinos generalmente no presenta ningún otro defecto organoléptico y pueden comercializarse tras un adecuado tratamiento, que suele consistir en agitación del vino y posterior sulfitado y filtración. También puede realizarse un tratamiento de calor antes del embotellado a fin de proteger a estos vinos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000; Sponholz, 1993).

Otra alteración que pueden provocar las BL es el **amargor** producido como consecuencia de la degradación del glicerol (formado por las levaduras durante la FA) para dar lugar a la formación de acroleína. La acroleína por sí misma no es amarga pero reacciona con los grupos fenólicos de los antocianos dando sensación de amargor. Por ello, esta alteración es más frecuente en vinos tintos de alto contenido fenólico que en vinos blancos. Su umbral de detección es bajo (10 ppm). La capacidad de degradar el

glicerol no está muy extendida entre las BL, sin embargo se ha encontrado que algunas cepas de *P. parvulus*, *Leuc. mesenteroides* y *L. cellobiosus* sí la presentan (Sponholz, 1993).

El “**olor a ratón**” o más bien a orina de ratón, es otra alteración que se puede presentar en vinos y está causado por la presencia de acetamida. Este olor es consecuencia de la formación de tres bases heterocíclicas 2-acetiltetrahidropiridina, 2-etiltetrahidropiridina, 2-acetil-1-pirrolina. Las vías de formación de estos compuestos aún son desconocidas, aunque Costello y Henschke (2002) sugieren que se forman a partir del catabolismo de los azúcares y del de los aminoácidos ornitina y lisina en presencia de etanol. Las bacterias responsables de la formación de estos compuestos son *L. hilgardii*, *L. brevis* y *L. cellobiosus*. Esta alteración no es muy común y suele ocurrir con mayor probabilidad en vinos de baja acidez insuficientemente sulfitados (Sponholz, 1993).

El “**olor animal**” se debe a la formación de fenoles volátiles como el 4-vinilfenol, 4-vinilguayacol, 4-etilfenol y 4-etilguayacol. Se ha demostrado que algunas cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* son responsables de la síntesis de etilfenoles, aunque también los producen levaduras de los géneros *Brettanomyces/Dekkera* (Muñoz *et al.*, 2005).

1.2.3 Efectos perjudiciales de las bacterias acéticas

La propiedad fisiológica más característica de las BA asociadas a la vinificación es su capacidad de producir ácido acético a expensas de la oxidación del etanol del vino. Este proceso se conoce como avinagramiento, acetificación, picado o acescencia; se suele denominar picado a la fase inicial de la alteración, limitada a las capas superficiales del vino donde comienzan a desarrollarse las BA, y avinagramiento al desarrollo más intenso y avanzado que ocupa un mayor volumen de líquido (Suárez y Iñigo, 1990).

Las BA han sido objeto de pocos estudios, a pesar de ser muy corrientes en los vinos. El poco interés que ha suscitado este grupo de bacterias en el mundo enológico se debe a que tienen un metabolismo aerobio estricto por lo que sólo pueden desarrollarse en la superficie de contacto vino-aire (Lafon-Lafourcade y Joyeux, 1981), por ello se

consideraba que su presencia no constituía un problema si se evitaba la exposición al aire de los vinos.

La formación de ácido acético por parte de las BA va siempre acompañada de la formación de acetato de etilo, cuya presencia es siempre negativa en la apreciación organoléptica, ya que confiere el olor a pegamento característico del vino picado, y que es perceptible a partir de 18 ppm (Sefridge y Amerine, 1980). Esta es la sustancia responsable de los verdaderos caracteres de la acescencia (Soufleros y Bertrand, 1979). El ácido acético que posee un umbral de percepción muy bajo, confiere el carácter de acritud a los vinos picados.

Los primeros trabajos sobre identificación de cepas aisladas de vinos y de los factores que favorecen su desarrollo o su inhibición se deben a Dupuy y Melamed (1956). En el caso de uvas infectadas por *Botrytis cinerea*, la rotura de la piel del grano por el hongo hace que el zumo de la baya esté expuesto a los microorganismos presentes en la superficie facilitando el crecimiento de las BA. Por eso se encuentra una alta concentración de ácido glucónico en las uvas botritizadas, debido a la transformación de la glucosa en ácido glucónico por parte de *Gluconobacter* (Sponholz, 1993). Los trabajos de Joyeux *et al.* (1984) evidenciaron que *A. aceti* y *G. oxydans* utilizan las pequeñas cantidades de etanol que sintetizan las levaduras al inicio de la fermentación para producir ácido acético. Este proceso sucede con mucha más velocidad en vinos terminados expuestos al aire.

Las BA son capaces de ocasionar otra serie de alteraciones distintas a la degradación del etanol, así algunas cepas de *A. pasteurianus* pueden degradar ligeramente el glicerol a dihidroxiacetona, influyendo de esta manera en la calidad del vino (Yamada y Kondo, 1984). *A. aceti* y *A. pasteurianus* producen acetaldehído y acetato de etilo (Lafon-Lafourcade y Joyeux, 1981) y catabolizan el ácido L-málico y el cítrico, lo que conduce a una fuerte acetificación. Numerosos estudios mencionan la capacidad ambas especies de oxidar totalmente los ácidos láctico, pirúvico y acético, a anhídrido carbónico y agua (De Ley, 1961).

Además de provocar todas estas alteraciones en la composición del vino, las BA pueden inhibir parcialmente el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y por tanto alterar la marcha de la FA llegando incluso a su paralización (Drysdale y Fleet, 1989;

Lafon-Lafourcade, 1983). Se ha comprobado que el ácido acético producido por las bacterias actúa como inhibidor de las levaduras; ciertas cepas de *Gluconobacter* son capaces de segregar otras sustancias “antilevaduras” todavía desconocidas (Suárez e Iñigo, 1990). El desarrollo previo de las BA en el mosto de uva influye posteriormente sobre el crecimiento y el metabolismo de las BL. Este fenómeno parece variable según la edad de cultivo y las especies de BA y lácticas presentes (Joyeux *et al.*, 1983). Así, en mostos que hayan sufrido un breve desarrollo de BA (*G. oxydans* y de *A. aceti* durante 3 días) se favorece el crecimiento del crecimiento de *O. oeni* y de *L. hilgardii* y se estimula la FML (Joyeux *et al.*, 1983).

En la práctica de la conservación del vino, se tiene interés en limitar lo máximo posible el número de las BA que contiene el vino, utilizando técnicas apropiadas de clarificación, filtración y sulfitado; sin embargo, un vino siempre tiene suficientes bacterias para sufrir un picado acético si se dan las condiciones adecuadas para su desarrollo (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2000).

1.3 Posición taxonómica de bacterias lácticas

El grupo de BL carece de entidad taxonómica como tal, comprende a un grupo de microorganismos muy heterogéneo que comparten una serie de características bioquímicas y estructurales: son Gram positivos de metabolismo quimiorganotrofo, no esporulados, catalasa-negativo, desprovistos de citocromos, anaerobios, microaerófilos o aerotolerantes, acidófilos o acidotolerantes, y estrictamente fermentadores produciendo ácido láctico como producto final de la fermentación de azúcares (Holt *et al.*, 1994).

La 7ª y 8ª ediciones del “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” recogían la existencia de cuatro géneros dentro de las BL: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*; la clasificación de las cepas en cada uno de ellos venía determinada por los mismos criterios que utilizó Orla-Jensen (1919). En la actualidad existen 19 géneros en el grupo de las BL típicas, los cuales forman una línea de descendencia común con otras bacterias Gram+ de contenido en G+C <50%, a esta línea de descendencia se la llama rama *Clostridium*. La proliferación de géneros dentro del grupo de las BL ha sido el resultado de la aplicación de técnicas de caracterización muy potentes que han proporcionado información tanto a nivel de fenotipo como de genotipo. Los nombres de estos 19 géneros de BAL son *Aerococcus*, *Atopobium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Fructobacillus*, *Paralactobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Doyle y Meng, 2006; Endo y Okada, 2008; Holzapfel y Wood, 1998; Leisner *et al.*, 2000). Otros géneros muy relacionados filogenéticamente con los anteriores, son *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Globicatella* y *Lactosphaera*. El género *Bifidobacterium* que en ocasiones se ha considerado como perteneciente a las BL en función de sus semejanzas bioquímicas, constituye una línea de descendencia distinta, la denominada rama *Actinomycetes* con un porcentaje de C+G >50% (Holzapfel y Wood, 1998).

De todos estos géneros de BL sólo 4 se han descrito en vinos *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Pediococcus*. El género *Lactobacillus* es el más extenso en cuanto a número de especies se refiere y constantemente se están describiendo nuevas, en la actualidad hay más de 100 especies validadas (Euzéby, 1998-2006; Felis y

Dellaglio, 2007). Algunas de las antiguas especies de este género se han transferido a tres nuevos géneros *Carnobacterium*, que comprende además algunas BL atípicas asociadas a productos refrigerados de carne o pescado, *Weissella* un género de reciente creación en el cual se agrupan antiguos lactobacilos y algunas especies de *Leuconostoc*, como *Leuc. paramesenteroides*, y *Atopobium* en el que también se encuentran algunas antiguas especies de *Streptococcus*. En la 8ª edición del “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” el género *Leuconostoc* estaba formado por 6 especies: *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. dextranicum*, *Leuc. cremoris*, *Leuc. lactis*, *Leuc. oenos* y *Leuc. paramesenteroides*. Estudios posteriores de hibridación ADN-ADN y ARN-ADN demostraron que las tres primeras especies en realidad constituían subespecies de *Leuc. mesenteroides* (*cremoris*, *dextranicum* y *mesenteroides*). El análisis de secuencias de los genes ribosomales 23S llevaron a la conclusión de que *Leuc. oenos* constituía una línea evolutiva independiente del género *Leuconostoc* y se propuso su reclasificación en un nuevo género y especie: *O. oeni*. Igualmente ocurrió con la especie *Leuc. paramesenteroides*, de la cual se observó que presentaba una mayor homología interna con algunos lactobacilos heterofermentativos que con los propios *Leuconostoc*, por ello se definió un nuevo género *Weissella* donde se agruparon todas estas especies de elevada homología. Muy recientemente, cuatro especies del género *Leuconostoc* (*Leuconostoc durionis*, *Leuconostoc ficulneum*, *Leuconostoc fructosus*, y *Leuconostoc pseudoficulneum*) descritas en los últimos años se han reclasificado en un nuevo género *Fructobacillus* con los nombres de *Fructobacillus durionis*, *Fructobacillus ficulneum*, *Fructobacillus fructosus* y *Fructobacillus pseudoficulneum* (Endo y Okada, 2008). Otras tres nuevas especies *Leuconostoc holzapfelii*, *Leuconostoc inhae* y *Leuconostoc kimchii* han sido descritas en los últimos años (de Bruyne et al., 2007; Kim et al. 2000; Kim et al. 2003), de manera que en la actualidad el género está formado por 11 especies (*Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc fallax*, *Leuconostoc gasocomitatum*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc holzapfelii*, *Leuconostoc inhae*, *Leuconostoc kimchii*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* y sus tres subespecies, y *Leuconostoc pseudomesenteroides*). El género *Pediococcus* tal y como se describía en el “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”, el “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” de 1994 y el “The Prokaryotes” en su última edición, estaba formado por nueve especies. Sin embargo, Bergan et al. (1984), basándose en un

estudio de composición celular en ácidos grasos e hidratos de carbono de los géneros *Aerococcus* y *Pediococcus* consideraron que la especie *P. urinaequi* era un sinónimo posterior de la especie *Aerococcus viridans*, por lo que el género *Pediococcus* solo tendría 8 especies. En un trabajo posterior de Collins y colaboradores, basándose en estudios de homologías DNA-DNA y de comparación de secuencias del 16S, demostraron que sólo *Pediococcus acidilactici*, *P. damnosus*, *Pediococcus dextrinicus*, *Pediococcus inopinatus*, *P. parvulus* y *P. pentosaceus* forman un grupo filogenético coherente, mientras que *Pediococcus urinaequi* y *A. viridans* forman una línea evolutiva diferente y presentan elevada homología entre ellos confirmando lo hallado por Bergan. No se encontraron especies filogenéticamente afines a *Pediococcus halophilus* por lo que propusieron su reclasificación en un nuevo género *Tetragenococcus*. En los últimos años se han descrito nuevas especies pertenecientes al género *Pediococcus*, de forma que actualmente contiene las especies *P. acidilactici*, *Pediococcus argentinicus* (De Bruyne et al., 2008) *Pediococcus cellicola*, *Pediococcus claussenii*, *P. damnosus*, *P. dextrinicus*, *Pediococcus ethanolidurans*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, *Pediococcus siamensis* (Tanasupawat et al., 2007) y *Pediococcus stilesii* (Euzéby, 2008).

El género *Oenococcus* hasta fecha muy reciente contenía una única especie, *O. oeni* (syn. *Leuc. oenos*), sin embargo recientemente se ha descrito la existencia de una bacteria láctica que parece pertenecer a este mismo género y para la cual se propone el nombre de *Oenococcus kitaharae* (Endo y Okada, 2006). Esta bacteria no se ha aislado de vino, no presenta actividad maloláctica, ni es acidófila.

La relación actual de las especies aceptadas de BL (“Approved List of bacterial Names”, Euzéby, 1998-2008) puede consultarse en la siguiente dirección electrónica: <http://www.bacterio.cict.fr> y sus características más relevantes en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de los géneros de BL presentes en el vino (Dicks, 1995; Schleifer *et al.*, 1995; Stiles y Holzapfel, 1997).

Género	Categoría metabólica respecto a hexosas	Tipo de isómero del ácido L-láctico	Morfología celular	Tipo de agrupación
<i>Lactobacillus</i>	Homo/heteroláctico	D(-), L(+) y DL, según la especie	Bacilos 1-5 μm x 0.5-1 μm	Células aisladas, parejas o cadenas
<i>Pediococcus</i>	Homoláctico	L(+) y DL, según la especie	Cocos 0.5-1 μm	Parejas o tétradas
<i>Leuconostoc</i>	Heteroláctico	D(-)	Cocos 0.5-1 μm	Parejas o cadenas
<i>Oenococcus</i>	Heteroláctico	D(-)	Cocos 0.5-1 μm	Parejas o cadenas

1.4 Posición taxonómica de bacterias acéticas

La novena edición del “Bergey's Manual of Systematic Bacteriology” (Buchanan y Gibbons, 1984) clasificaba las BA dentro de la familia *Acetobacteraceae* y reconocía sólo 2 géneros: *Acetobacter* y *Gluconobacter*. El primero estaba compuesto por 7 especies *A. aceti*, *A. liquefaciens* (actualmente *Gluconacetobacter liquefaciens*), *A. pasteurianus*, *A. hansenii* (actualmente *Gluconacetobacter hansenii*), *Acetobacter diazotrophicus* (actualmente *Gluconacetobacter diazotrophicus*), *Acetobacter europaeus* (actualmente *Gluconacetobacter europaeus*) y *Acetobacter methanolicus*, y el segundo *Gluconobacter*, compuesto únicamente por la especie *G. oxydans*. El actual estatus taxonómico de las BA fue reconsiderado en la revisión de Swings y De Ley (1981) y De Ley *et al.* (1984a), pero hubo que esperar hasta la aplicación de técnicas de análisis numérico (Gossele *et al.*, 1982; Kersters y De Ley, 1975), de perfiles de ácidos grasos (Yamada *et al.*, 1981b), de proteínas solubles (Gosselé *et al.*, 1982; Gosselé *et al.*, 1983; Swings *et al.*, 1980), y de hibridación rARN-ADN (Gillis, 1978; Gillis y De Ley, 1980; Sievers *et al.*, 1994a; Swings *et al.*, 1980; Yamada *et al.*, 1981a; Yamada *et al.*, 1984), para establecer de forma concluyente la posición taxonómica de las BA. Estudios taxonómicos más recientes basados en secuencias parciales del 16S rARN han mostrado que especies pertenecientes hasta ese momento al género *Acetobacter* pertenecían a un nuevo género denominado *Gluconacetobacter* (Yamada *et al.*, 1997). En la misma publicación se recoge la descripción de un nuevo género de la familia *Acetobacteraceae*, el género *Acidomonas* (Yamada *et al.*, 1997). En los últimos años se han definido otros dos nuevos géneros: *Asaia* (Yamada, 2000) y *Kozakia* (Lisdiyanti *et al.*, 2001). Actualmente se reconocen 34 especies de BA, incluidas en los 6 siguientes géneros: *Acetobacter* (A), *Gluconobacter* (G), *Acidomonas* (Ac), *Gluconacetobacter* (Ga), *Asaia* (As), y *Kozakia* (K) (ver Figura 1). La lista de especies actualmente validadas pertenecientes a la familia *Acetobacteraceae*, una rama de las bacterias acidofílicas en la subdivisión α -*Proteobacteria* (De Ley *et al.*, 1984b; Sievers *et al.*, 1994a), puede consultarse en la siguiente dirección electrónica: <http://www.bacterio.cict.fr> (“Approved List of bacterial Names”, Euzéby, (1998-2008)).

Estas bacterias son Gram negativas, aerobias estrictas y de morfología variable; generalmente las células son bacilares en pareja y a veces forman cortas cadenas. Su

tamaño varía entre 0.4 a 1 μm de ancho y de 0.8 a 4.5 μm de largo, siendo frecuentes las formas de involución más alargadas e irregulares. Hay especies inmóviles, mientras que otras son móviles presentando flagelos polares o peritricos. Algunas especies están pigmentadas y a veces producen celulosa u otros polisacáridos (De Ley *et al.*, 1984b).

Los criterios bioquímicos y fisiológicos que se utilizan para la identificación a nivel de género en las BA son su capacidad para oxidar D,L-lactato a CO_2 y H_2O , el grado de oxidación de etanol, la capacidad para formar pigmentos solubles en agua, la capacidad de oxidar glicerol, la de producir ácido 5-cetoglucónico a partir de glucosa, y la propiedad de crecer en medios que contengan etanol y acetato como única fuente de carbono (Drysdale y Fleet, 1988; Bulygina *et al.*, 1992; Sievers *et al.*, 1994a; Swings *et al.*, 1992; Urakami *et al.*, 1989). Así, las especies de los géneros *Acetobacter* y *Gluconacetobacter* oxidan etanol a ácido acético, pero también pueden oxidar completamente este ácido a CO_2 y H_2O . Las especies de *Gluconobacter* se caracterizan por su incapacidad para oxidar el acético hasta CO_2 y H_2O y por oxidar parcialmente el etanol a ácido acético. El género *Acidomonas* se caracteriza por su capacidad para crecer en metanol. El género *Asaia* por su incapacidad para crecer en un medio con una concentración superior al 0,35% de ácido acético. Además de por estas características metabólicas los géneros *Acetobacter* y *Gluconacetobacter*, pueden diferenciarse de los otros en base al tipo de ubiquinona que presentan, así *Acetobacter* presenta la ubiquinona Q9 y *Gluconobacter* la ubiquinona Q10 (Trček y Teuber, 2002).

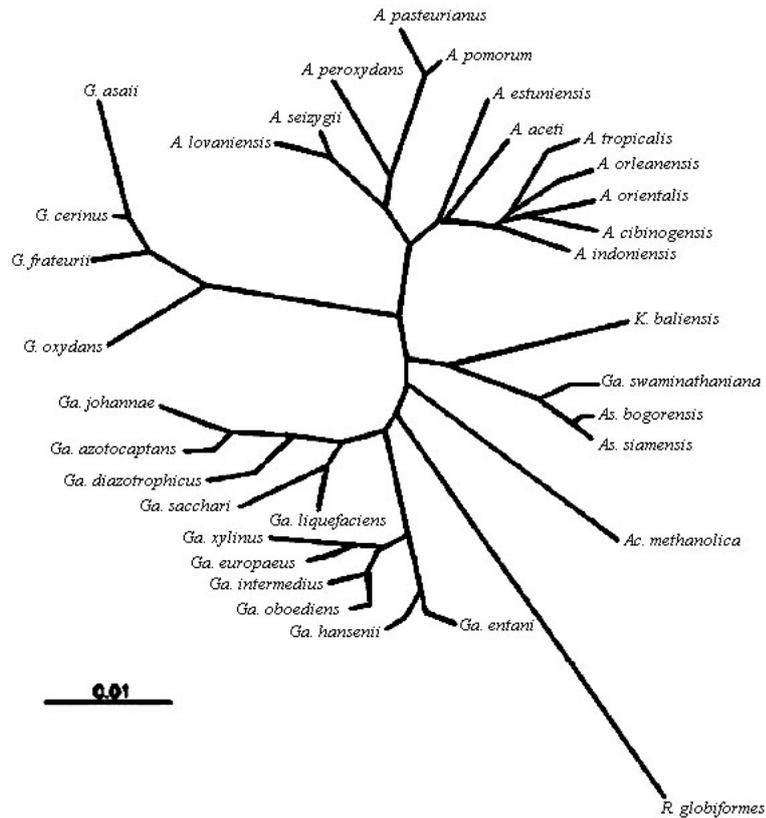


Figura 1. Árbol filogenético construido en base a la secuenciación del gen ribosomal 16S de BA (Fuentes *et al.* 2003)

Las principales especies encontradas en el vino pertenecen a los géneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* y *Gluconobacter*, y son *A. aceti*, *Acetobacter oeni*, *A. pasteurianus*, *Ga. liquefaciens*, *Ga. hansenii* y *G. oxydans* (González *et al.* 2004; Ruiz *et al.*, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

1.5 Métodos de identificación, tipificación y detección de bacterias del vino

La identificación de un microorganismo consiste en asignarlo a una especie validada y bien caracterizada en base a las propiedades que presentan los microorganismos que se comparan. La tipificación consiste en la discriminación entre cepas muy relacionadas entre sí y pertenecientes a la misma especie pero no al mismo clon. La detección de un microorganismo en una muestra consiste en obtener la evidencia de su presencia en esa muestra mediante distintas metodologías. Tanto la identificación como la tipificación son de importancia capital para llevar a cabo estudios sobre dinámicas de poblaciones en el vino, así como sobre la implantación de las cepas inoculadas. Las técnicas que permiten la detección son muy importantes a la hora de determinar la presencia de determinados microorganismos responsables de alteraciones en los vinos.

1.5.1 Bacterias lácticas

La identificación de las BL de los vinos ha sido abordada con diferentes técnicas. Las primeras identificaciones se llevaron a cabo utilizando criterios fenotípicos que incluían aspectos tales como morfología y agrupamiento celular, características fisiológicas, y características bioquímicas. Muchos investigadores han llevado a cabo la caracterización bioquímica y la identificación de las BL del vino usando métodos miniaturizados, tales como la galería API 50 CH (Costello *et al.*, 1983; Davis *et al.*, 1988; Dicks y Van Vuuren, 1988; Lafon-Lafourcade y Joyeux, 1979; Millière *et al.*, 1989; Tracey y Britz, 1987; Wibowo *et al.*, 1985). Estas galerías simplifican mucho las tareas de identificación, sin embargo hay que ser cautos en la interpretación de los resultados, ya que especies distintas pueden presentar el mismo perfil fermentativo, lo que lleva a identificaciones incorrectas (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2000). Además, especies de lento o difícil crecimiento como *O. oeni* son muy poco reactivas en este sistema y por tanto muestran perfiles fermentativos diferentes de los que se obtienen en sistemas no miniaturizados (Jensen y Edwards, 1991; Pardo *et al.*, 1988). También se han publicado trabajos en los que se aplican técnicas de taxonomía numérica para la

identificación de BL del vino, en los cuales se analizan un gran número de características fenotípicas (Tracey y Britz, 1987).

Durante los últimos años, la aparición de nuevas herramientas de biología molecular ha permitido la identificación de especies de BL del vino de forma más rápida y segura. Los primeros métodos moleculares empleados para la identificación de estos microorganismos fueron el análisis de proteínas totales (Dicks, 1995; Dicks y Van Vuuren, 1988; Dicks y Van Vuuren, 1990; Du Plessis *et al.*, 2004), el de ácidos grasos celulares (Schmitt *et al.*, 1989; Tracey y Britz, 1989) y la hibridación de ácidos nucleicos; en este último apartado se incluyen técnicas de hibridación ADN-ADN que hacen uso de sondas marcadas de ADN total y que se pueden aplicar sobre colonia (Lonvaud-Funel *et al.*, 1989; Lonvaud-Funel *et al.*, 1991), sobre células enteras (*in situ*) (Sohier y Lonvaud-Funel, 1998) o sobre ADN purificado (Dicks *et al.*, 1990; Schillinger *et al.*, 1989). También se incluye en esta metodología la hibridación ADN-rARN, en la cual se basa la hibridación fluorescente *in situ* o FISH; en este último caso se utilizan sondas de ADN de unos 20-28 nucleótidos complementarias de regiones específicas de los ARN ribosómicos 16S y marcadas con fluorocromos (Blasco *et al.*, 2003). Otras técnicas identificativas se basan en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, entre ellas están la PCR específica (Bartowsky y Henschke, 1999; Sohier *et al.*, 1999; Zapparoli *et al.*, 1998), PCR multiplex (Mora *et al.*, 2000), RAPD (Guerrini *et al.*, 2003) y la amplificación de secuencias que codifican para los espacios intergénicos 16-23S rARN (ISR o ITS) (Chenoll *et al.*, 2003) o para la región V3 del 16S rARN (Guerrini *et al.*, 2003). Otras técnicas combinan la amplificación por PCR de las regiones que codifican para los genes ribosomales o sus espaciadores (ISR o ITS) con la digestión de los productos de amplificación: 16S-ARDRA y RFLP-ITS (Chenoll *et al.*, 2003; Rodas *et al.*, 2003). Otra metodología utilizada para la identificación de las bacterias del vino ha sido el ribotipado, que se basa en la digestión del ADN total con enzimas de corte frecuente y posterior hibridación de las bandas generadas con sondas ribosomales marcadas (Rodas *et al.*, 2005; Viti *et al.*, 1996). Algunas de las metodologías descritas también son útiles para la discriminación de cepas dentro de la especie (tipificación); las técnicas que se han utilizado para tal fin han sido: el análisis de los perfiles de restricción del ADN total con enzimas de corte frecuente (REA) (Prévost *et al.*, 1995; Viti *et al.*, 1996) y de corte infrecuente (PFGE-RFLP) (Daniel *et*

al., 1993; Guerrini *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 1993; Pardo *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2001; Zapparoli *et al.*, 2000), el análisis de perfiles de RAPD (Zapparoli *et al.*, 2000), el ribotipado (Viti *et al.*, 1996), la PCR multiplex (Reguant y Bordons, 2003), los análisis de polimorfismos de fragmentos de amplificación (AFLP) (Kunene *et al.*, 2000) y la secuenciación de genes *housekeeping* (MLST) (De Las Rivas *et al.*, 2004).

Algunas de estas técnicas se han utilizado también para el desarrollo de métodos de detección de BL en vinos, tales como la PCR específica, PCR cuantitativa, la hibridación sobre colonia, *in situ* o FISH. Uno de los métodos más prometedores por su sencillez y rapidez en la obtención de resultados es el método del FISH, que permite la detección, identificación y el recuento de especies en medios naturales (Amman *et al.*, 1990b; Bottari *et al.*, 2006). Este método requiere el diseño de sondas que hibriden con los ARNr (Amman *et al.*, 1990b; Blasco *et al.*, 2003). Actualmente las bases de datos de secuencias del gen 16S rADN están creciendo con gran rapidez. Con la ayuda de paquetes informáticos estas secuencias pueden ser examinadas, y se pueden diseñar sondas útiles para identificar a diferentes niveles taxonómicos.

En la Figura 2 se muestra el poder resolutivo de diferentes técnicas moleculares.

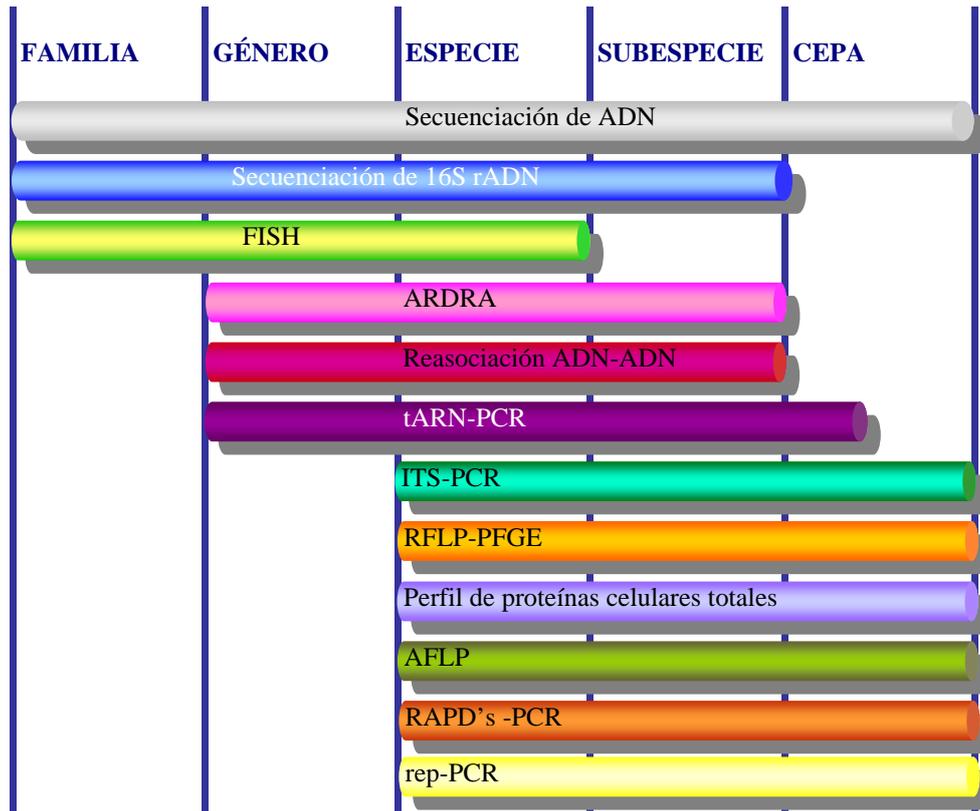


Figura 2. Poder discriminante de las técnicas moleculares (adaptado y modificado de Savelkoul *et al.*, 1999). FISH: Hibridación fluorescente *in situ*; ARDRA: Análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado; tARN-PCR: análisis del espaciador intergénico codificante de un ARN de transferencia; ITS-PCR: análisis del espaciador intergénico 16S-23S; RFLP: análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción; RFLP-PFGE: análisis de fragmentos de restricción del ADN total cortado con enzimas de baja frecuencia de corte; AFLP: análisis de polimorfismos de fragmentos de digestión y posterior amplificación selectiva; RAPD: análisis de fragmentos de amplificación generados con cebadores que se unen aleatoriamente al ADN total; rep-PCR: análisis se fragmentos de amplificación de elementos repetitivos.

1.5.2 Bacterias acéticas

La identificación de BA mediante pruebas bioquímicas, morfológicas y fisiológicas se basa en los criterios que usaron previamente Visser't Hooft (1925), Asai (1968) y

Frateur (1950), y han sido utilizados por varios investigadores durante los últimos 30 años (Bartowsky *et al.*, 2003; Joyeux *et al.*, 1984; Schuller *et al.*, 2000; Swings y De Ley, 1981; Yamada *et al.*, 1999). También, como en el caso de las BL, se ha utilizado el análisis de patrones electroforéticos de proteínas totales con fines identificativos (Kerstens y De Ley, 1975, Gosselé *et al.*, 1983; De Ley *et al.*, 1984b). Pero la mayor parte de los métodos moleculares de identificación utilizan el análisis de los ácidos nucleicos con diferentes aproximaciones. Se han identificado especies de BA utilizando la hibridación ADN/rADN (De Ley y Schell, 1963; Gillis y De Ley, 1980). También se ha usado la técnica RAPD's para discriminar las distintas especies de BA del vino (Bartowsky *et al.*, 2003; Trček *et al.*, 1997). En ocasiones se utiliza la secuenciación del gen del ribosomal 16S ADN para diferenciar entre especies (Sievers *et al.*, 1994b; Sievers *et al.*, 1996; Schuller *et al.*, 2000). Una técnica de identificación que se basa en las diferencias en la secuencia de este gen pero que es de más sencilla realización e interpretación es la denominada 16S-ARDRA; consiste en la amplificación el gen ribosomal 16S y en la posterior digestión del amplificado (González *et al.*, 2005a; Poblet *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2000; Trček y Raspor, 1999). A veces la identidad de secuencia entre especies es tan alta que estas técnicas impiden la correcta separación de algunas especies. En estos casos se puede recurrir al análisis de las secuencias intergénicas 16S-23S (ISR o ITS), que exhiben un mayor grado de variación que las secuencias de los genes ribosomales 16S y 23S. Ello se debe a que la mayoría de las bacterias tienen varias copias del operón ribosómico, en cada una de ellas la longitud y la secuencia de los distintos fragmentos intergénicos pueden variar (Barry *et al.*, 1991; Kretova y Grones, 2005a; Navarro *et al.*, 1992; Trček y Teuber, 2002). Por ello, el análisis de los polimorfismos de los fragmentos intergénicos amplificados puede constituir por sí mismo o combinado con posterior digestión o secuenciación; una técnica útil para la discriminación a nivel de género, especie y cepa (Kretova y Grones, 2005b; Ruiz *et al.*, 2000; Trček y Teuber, 2002; Yukphan *et al.*, 2004a; Yukphan *et al.*, 2004b).

La secuenciación de otros genes distintos de los genes ribosomales también se ha utilizado con fines identificativos. Así, Trček (2005) utilizó el análisis de una secuencia parcial del gen de la alcohol deshidrogenasa dependiente de la quinona pirroloquinolina para la identificación de algunas especies en la que el porcentaje de similitud del gen

16S rADN era superior a 99% (Trček, 2005). En este trabajo también se recoge el desarrollo de cebadores específicos para la detección de *A. aceti*. Otras técnicas de uso común para detectar BA en distintos medios son la PCR específica y la hibridación *in situ* (FISH), que pueden aplicarse a nivel de especie, género o incluso familia (Franke *et al.*, 2000; Franke *et al.*, 2005; Navarro y Komagata, 1999). En los últimos años se han aplicado nuevas técnicas como la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) para analizar las poblaciones de BA tanto en vinagre balsámico como en vino (De Vero *et al.*, 2006; López *et al.*, 2003).

En ocasiones se requieren técnicas que permitan la discriminación entre cepas pertenecientes a la misma especie, algunas de las utilizadas para tipificar BA son: la distribución de quinonas respiratorias, el análisis de polimorfismos de amplificación de la región repetitiva consenso de enterobacterias (ERIC-PCR), el análisis de polimorfismos de amplificación de la región palindrómica extragénica (REP-PCR) y el análisis de los perfiles plasmídicos (Fukaya *et al.*, 1985; González *et al.*, 2005; González *et al.*, 2004; Mariette *et al.*, 1991; Yamada y Kondo, 1984). Esta última técnica ha sido recientemente empleada para el análisis de cepas de *Gluconobacter* y *Acetobacter* (Trček *et al.*, 2000).

Además de su utilidad en los estudios de clasificación, la secuenciación del rARN se ha usado para desarrollar métodos rápidos de identificación bacteriana. Mediante el análisis de las secuencias parciales del rARN 16S es posible encontrar patrones de secuencias específicos para grupos, especies o incluso serotipos bacterianos. Para la identificación de los microorganismos a nivel de especie, se han desarrollado sondas específicas de la región variable del rARN 16S de tamaño entre 18-28 nucleótidos. Las diferencias en las regiones conservadas proporcionan igualmente secuencias para el diagnóstico de grupos de organismos relacionados y pueden ser usadas como dianas para el diseño de sondas a niveles taxonómicos superiores al de cepa. Sondas específicas de rARN 16S y 23S han sido aplicadas para establecer diferentes grupos y especies, así como en la identificación de bacterias. La precisión de las inferencias filogenéticas de las secuencias del rARN depende del número de bases comparadas, y para ser completamente efectivas, al menos deben ser consideradas 1000 bases para cada organismo (Amann *et al.*, 1990b; Amann *et al.*, 1995).

2. Objetivos

Aunque no existe una normativa que contemple el análisis de tipo microbiológico en el proceso de elaboración de los vinos, no hay que perder de vista el que el vino es el producto de la fermentación del mosto de uva y en esta transformación intervienen gran cantidad de microorganismos. Estos microorganismos pueden ser beneficiosos, como *S. cerevisiae* y *O. oeni*, o perjudiciales como la gran mayoría de las BL y todas las BA. La adopción de medidas de control tempranas que eviten las alteraciones microbianas durante el proceso de vinificación o crianza es necesaria para obtener un vino de calidad. Por ello, el objetivo principal de este trabajo ha sido el desarrollo de una metodología rápida que permita detectar, identificar y cuantificar las BL y acéticas en el vino.

Este objetivo general se concreta en una serie de objetivos específicos, que se apuntan a continuación

1. Desarrollo de sondas fluorescentes para detección, identificación y cuantificación de especie de BL y BA del vino mediante microscopía de fluorescencia.

2. Desarrollo de cebadores específicos para detección mediante PCR específica de BA.

3. Evaluación de las técnicas desarrolladas frente al 16S-ARDRA como sistemas de identificación de BA en vino

4. Aplicación y evaluación de las técnicas anteriormente descritas (FISH, PCR específica y 16S-ARDRA) al estudio de la evolución de BA a lo largo de vinificaciones a nivel de laboratorio, planta piloto e industriales.

3. Material y Métodos

3.1 Microorganismos, medios de cultivo y de aislamiento, condiciones de crecimiento generales y condiciones de conservación

3.1.1 Bacterias lácticas

El listado de cepas de BL de referencia usadas en este trabajo aparece en la Tabla 2.

El crecimiento rutinario de las bacterias se llevó a cabo en MRS (Scharlab) adicionado de 0.5 g L⁻¹ de L-cisteína HCl (MRSm) para lactobacilos, pediococos y leuconostocs y en MLO (Caspritz y Radler, 1983) para *O. oeni* (ver Anexo I). La incubación se realizó a 28°C durante 5-7 días para *O. oeni*, y 2-4 días para el resto de BL (ver Tabla 1).

El aislamiento y recuento de BL a partir de las muestras procesadas en este trabajo se realizó por siembra en superficie de las muestras convenientemente diluidas en placas de MLO (Caspritz y Radler, 1983) y MRS (Scharlab) suplementados con 1mg mL⁻¹ de natamicina, a fin de evitar el desarrollo de levaduras también presentes en las muestras. La incubación de las placas sembradas se realizó durante los mismos tiempos y en las mismas condiciones que se han descrito para el cultivo de cepas puras.

Los métodos de conservación que se han empleado han sido

a) Subcultivo en líquido para conservación durante periodos inferiores a una semana a 4°C; para periodos de hasta 2 meses se mantuvieron en medio sólido a 4°C.

b) Congelación: para la conservación a medio plazo (3 meses y 2 años), se congelaron a -20°C con glicerol estéril 15% final (v/v).

d) Liofilización: para la conservación a largo plazo se procedió a su liofilización. Las células crecidas en medio líquido hasta inicio de fase exponencial se recogieron por centrifugación a 6000 g durante 15 minutos, y se lavaron en igual volumen de una solución estéril de ácido glutámico 0.067 M. Se recuperaron las células por centrifugación en las mismas condiciones anteriormente descritas, y se resuspendieron en un volumen 25 veces menor de la solución de ácido glutámico. La suspensión celular obtenida se repartió en tubos de liofilizar, se congeló en N₂ líquido y se liofilizó durante 18 horas en un liofilizador Virtis. Posteriormente, los tubos se cerraron al vacío y se almacenaron a 4°C.

Tabla 2. Listado de cepas de referencia de BL utilizadas en este trabajo.

Especies	Cepa	Número de acceso ^a	Medios y condiciones de cultivo (ver Anexo I)
<i>Lactobacillus brevis</i>	CECT 216	M58810	MRSm pH 6.5 a 28°C
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 334	D86517	
<i>Lactobacillus casei</i>	CECT 475 ^T	D16551	
<i>Lactobacillus collinoides</i>	CECT 922 ^T	AB005893	
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	CECT 982 ^T	M58813	
<i>Lactobacillus farciminis</i>	CECT 571 ^T	M58817	
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	NCFB 264 ^T	M58821	
<i>Lactobacillus mali</i>	NCFB 110	M58824	
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	CECT 4022 ^T	D79212	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CECT 748 ^T	D79210	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CECT 906 ^T	D16552	
<i>Lactobacillus zeae</i>	ATCC 15820 ^T	D86516	
<i>Leuconostoc carnosum</i>	CECT 4024 ^T	AB022925	
<i>Leuconostoc citreum</i> (syn: <i>Leuc. amelibiosum</i>)	CECT 4018	N.D.	
<i>Leuconostoc citreum</i>	CECT 4025 ^T	AF111948	
<i>Leuconostoc fallax</i>	DSM 20189 ^T	N.D.	
<i>Leuconostoc gelidum</i>	CECT 4026 ^T	AF175402	
<i>Leuconostoc lactis</i>	DSM 20202 ^T	N.D.	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	CECT 872 ^T	AB023247	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	CETC 912 ^T	AB023244	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	CECT 219 ^T	X95978	
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	CECT 4027 ^T	AB023237	
<i>Pediococcus acidilactici</i>	CECT 5911	N.D.	
<i>Pediococcus acidilactici</i>	CECT 5912	N.D.	
<i>Pediococcus acidilactici</i>	CECT 5913	N.D.	
<i>Pediococcus acidilactici</i>	CECT 5914	N.D.	
<i>Pediococcus acidilactici</i>	CECT 5915	N.D.	
<i>Pediococcus acidilactici</i>	CECT 98	M58833	
<i>Pediococcus inopinatus</i>	CECT 4777	AJ271383	
<i>Pediococcus parvulus</i>	CECT 813 ^T	D88528	
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	CECT 923	M58834	
<i>Pediococcus damnosus</i>	DSM 20331 ^T	D87678	MRSm pH 5.5 a 28°C
<i>Oenococcus oeni</i>	CECT 217 ^T	M35820	MLO a 28°C
<i>Weissella confusa</i>	DSM 20196 ^T	N.D.	MRSm pH 6.5 a 28°C

^a Número de acceso en bases de datos públicas de secuencias de ADN del gen 16S rADN; N.D.: No disponible; CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; Universidad de Valencia, Burjassot, Spain; NCFB: National Collection of Food Bacteria c/o NCIMB Ltd Aberdeen, Scotland, United Kingdom; DSM: German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany; ATCC: American Type Culture Collection, Manassa, USA.

3.1.2 Bacterias acéticas

El listado de las cepas de referencia de BA usadas en este trabajo aparece en la Tabla 3.

El crecimiento rutinario de las bacterias se llevó a cabo en los medios descritos en la Tabla 3 en forma sólida o líquida. El cultivo se realizó a 28°C durante 3-4 días en condiciones aeróbicas. En el caso de medio líquido la aireación se consiguió mediante agitación.

El aislamiento y recuento de BA a partir de las muestras de vinos analizadas en este trabajo se realizó por siembra en superficie en medios MA y medio GYA suplementados con 1 mg mL⁻¹ de natamicina y 1 mg mL⁻¹ de ampicilina, antibióticos que evitan respectivamente el desarrollo de levaduras y BL presentes en las muestras. Las muestras se diluyeron convenientemente antes de su siembra en los medios sólidos.

Los métodos de conservación que se han utilizado para este tipo de cepas han sido los mismos que para BL con la modificación de que en la liofilización se utilizó como crioprotector inositol al 5% en lugar de ácido glutámico. En el caso de algunas BA la biomasa que se liofilizó procedió de un cultivo crecido sobre placa en lugar de sobre medio líquido, ya que las células exhibieron mejor crecimiento en medio sólido que en líquido.

Tabla 3. Listado de cepas de referencia de BA utilizadas en este trabajo.

Especies	Cepas	Número de acceso ^a	Medios y condiciones de cultivo (ver Anexo I)
<i>Acetobacter aceti</i>	CECT 298 ^T	X74066	MA / GYA 28°C
<i>Acetobacter aceti</i>	LMG 1693	N.D.	
<i>Acetobacter aceti</i>	LMG 1372	N.D.	
<i>Acetobacter aceti</i>	LMG 1531	AJ130729 parcial	
<i>Acetobacter oeni</i>	CECT 5830 ^T	AY829472	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	CECT 474	N.D.	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	CECT 824	N.D.	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	DSM 3509 ^T	N.D.	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	LMG 1553	AJ130728	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	LMG 1607	N.D.	
<i>Acetobacter pomorum</i>	LMG 18848 ^T	AJ001632	RAE 28°C
<i>Acetobacter</i> sp.	CECT 944	N.D.	MA / GYA G.europ (sólo para <i>Gluconacetobacter</i> <i>europaeus</i>) 28°C
<i>Acidomonas methanolica</i>	LMG 1668 ^T	X73820	
<i>Frateuria aurantia</i>	LMG 1558 ^T	N.D.	
<i>Gluconobacter asaii</i>	LMG 1390 ^T	X80165	
<i>Gluconobacter cerinus</i>	LMG 1368 ^T	X80775	
<i>Gluconobacter frateurii</i>	LMG 1365	X82290	
<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>suboxydans</i>	CECT 360 ^T	X73820	
<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>suboxydans</i>	CECT 4009	N.D.	
<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>oxydans</i>	LMG 1408 ^T	X73820	
<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>sphaericus</i>	LMG 1414	N.D.	
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	LMG 7603 ^T	X75618	
<i>Gluconacetobacter europaeus</i>	DSM 6160 ^T	Z21936	
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	DSM 5602 ^T	N.D.	
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	LMG 1524	AJ0125443	
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	LMG 1529	AJ0125444	
<i>Gluconacetobacter intermedius</i>	DSM 11804	NA	
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	DSM 5603	X75617	
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	LMG 1348	N.D.	
<i>Gluconacetobacter oboediens</i>	DSM 11826 ^T	N.D.	
<i>Gluconacetobacter sacchari</i>	DSM 12717 ^T	N.D.	
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	CECT 315 ^T	N.D.	
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	CECT 473	N.D.	
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	DSM 2004	N.D.	
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	LMG 1515 ^T	X75619	Gx 28°C

^a Número de acceso en bases de datos públicas de secuencias de ADN del gen 16S rADN; LMG: (BCCM/LMG) Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent, Belgium. Ver significado del resto de abreviaturas de colecciones en Tabla 2.

3.2 Desarrollo de las técnicas de hibridación *in situ*

3.2.1 Diseño de sondas

El diseño de sondas a nivel de especie en los grupos de BL y BA se realizó mediante análisis de las secuencias del gen 16S rADN que están depositadas bases de datos públicas como GenBank y EMBL. Las especies diana para estos diseños se enumeran en la Tabla 3.

La especificidad de las secuencias diseñadas se analizó virtualmente usando los programas informáticos DNAMAN 4.03, Macaw 2.0.5, Bioedit 7.0.5.3 (Hall, 1999) y páginas de internet como BLAST (Altschul *et al.*, 1991). El diseño de los nucleótidos empleados como sondas se basó en las zonas de variabilidad del gen ribosomal 16S (V1, V2 y V6). Los lugares diana de los oligonucleótidos usados en este estudio se muestran en la Figura 3.

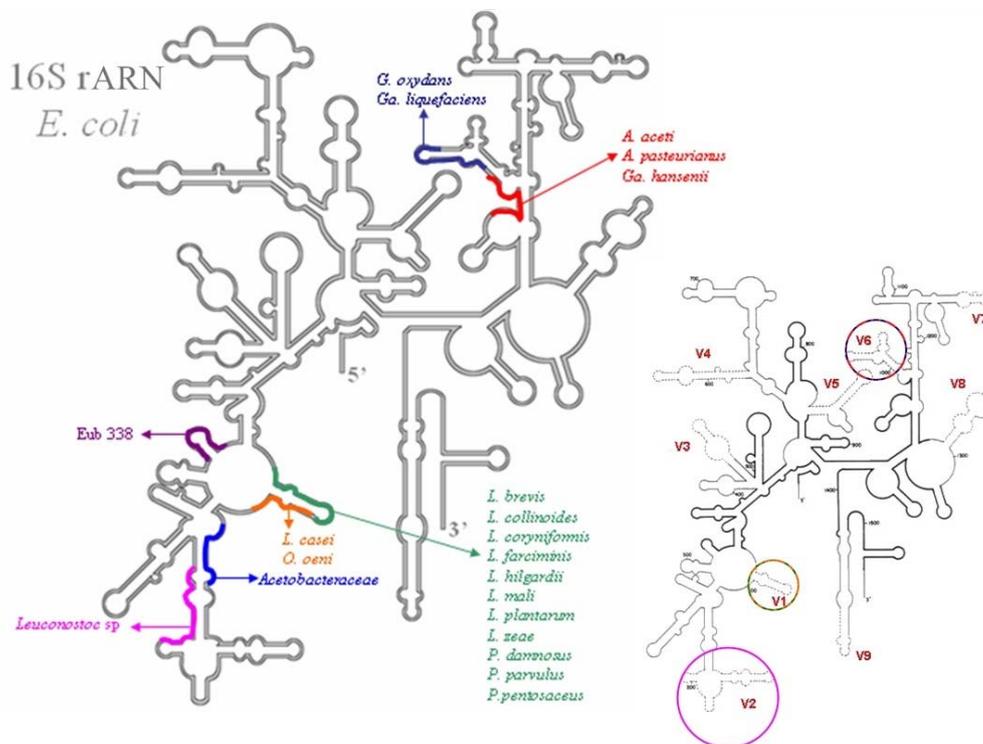


Figura 3. Esquema de la estructura secundaria del gen ribosomal del 16S en *E. coli* (organismo referencia) y posición de algunas sondas. Se muestran las regiones que presentan variabilidad entre las distintas especies de bacterias (regiones V).

Se encargó la síntesis y el marcaje de las sondas diseñadas a MGW-Biotech, (Ebersberg, Germany). Las sondas se marcaron en el extremo 5' con diferentes fluorocromos (Rhodamine Red[®], 5(6)-Carboxifluoresceína-N-hidroxisuccinamida éster, 6-Fam (carboxifluoresceína), Alexa Fluor 350, 5(6)-Carboxitrametilrodamina-N-hidroxisuccinamida éster (TAMRA), o Fluoresceína.

La lista de taxones para las cuales se diseñaron sondas, el nombre de la sonda y el fluorocromo utilizado para el marcaje fueron: *Eubacteria* (Eub 338, 6-Fam), *L. plantarum* (Lplan, Rhodamine Red[®]), género *Leuconostoc* (LU2, Fluoresceína), *P. pentosaceus* (Ppe, Fluoresceína), *L. brevis* (Lbrev, Alexa Fluor 350), *L. collinoides* (Lcoll, Tamra), *L. corynoides* (Lcory, Fluoresceína), *L. farciminis* (Lfarc, Tamra), *L. hilgardii* (Lhrg, Fluoresceína), *L. mali* (Lmali, 6-Fam), *L. paracasei* (Lpara, Fluoresceína), *L. zae* (Lzeae, Tamra), *O. oeni* (Ooeni, Fluoresceína y Marina Blue), *P. damnosus* (Pdamn, Rodamine Red[®] y Fluoresceína), *P. parvulus* (Pparv, Tamra y Fluoresceína), familia *Acetobacteraceae* (AABr, Fluoresceína), *A. aceti* (Aacet, Tamra y Fluoresceína), *A. pasteurianus/A. pomorum* (Apast, Rodamine Red[®]), *G. oxydans* (Goxy, Fluoresceína), *Ga. hanseni* (Ghans Fluoresceína), *Ga. liquefaciens* (Gliqu, Fluoresceína).

3.2.2 Fijación de las células a partir de cultivo puro, muestras de mosto o vino

Las células procedentes de cultivos puros o de muestras de mosto o vino se fijaron de modo diferente dependiendo de si se pretendía identificar/detectar BL o BA. Cuando se trabajó con cultivos puros de BL, se recogieron las células de 3 mL de medio líquido en fase exponencial, se centrifugaron (5 min a 13000 rpm en una Biofuge 13 de Heraeus), se lavaron 2 veces con 1 mL de PBS (0.13 M NaCl, 10mM NaPO₄, 7 mM Na₂HPO₄, 3mM NaH₂PO₄.2H₂O pH 7.2-7.4), se resuspendieron en 500 µL de PBS frío (4°C), y finalmente se mezclaron con 500 µL etanol 96% a -20°C. Las células se almacenaron a -20°C hasta su uso. En el caso de cultivos puros de BA, la resuspensión de las células tras la recuperación a partir del medio de cultivo, se realizó en 1 mL de PBS que contenía 4% de paraformaldehído, manteniéndose 1 h a 4°C en esta solución (Amann *et al.*, 1995; Franke *et al.*, 2000). Los pasos posteriores se llevaron a cabo como el caso de las BL.

La fijación de muestras de mosto o vino venía precedida de un recuento de células con la cámara de Thoma, de manera que se pudiera estimar la cantidad de mosto/vino a fijar. Si la

concentración de células era baja, la muestra se concentraba mediante centrifugación y se resuspendía en PBS, en un volumen menor al de partida, a fin de conseguir en el porta una concentración de células de 10^4 - 10^6 céls cm^{-2} . Posteriormente se realizaban 2 lavados con PBS. El sedimento obtenido se resuspendía en un volumen de 5 mL (1:1 PBS-Etanol 96%).

3.2.3 Hibridación en porta

3.2.3.1 Gelatinización de portas

La gelatinización tiene como finalidad aumentar la adherencia de las células al porta. Se utilizaron portas especiales de 10 pocillos cubiertos con teflón (10 well 6 mm HTC[®], Cel-Line/serie Thermo Fisher Scientific Co., Portsmouth, NH) (Amann *et al.*, 1990b). Se lavaron sumergiéndolos 1 hora en una solución de KOH al 10% en etanol. Transcurrido ese tiempo, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar al aire. Mientras tanto, se preparó la solución de gelatinización disolviendo 0.1% de gelatina (Swine skin gelatine type A, 175 bloom, Sigma) y 0.01% de $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ a 70°C. Los portas se sumergieron en esta preparación varias veces para que se cubrieran bien con una capa de gelatina y se dejaron secar en posición vertical sobre papel absorbente. Una vez secos se guardaron en un recipiente cerrado durante un máximo de 3 semanas para evitar la deshidratación y por tanto pérdida de propiedades.

3.2.3.2 Aplicación de las muestras y permeabilización

En cada pocillo del porta se colocó 1 μL de la muestra previamente fijada, y se dejó que se secara a temperatura ambiente (15 min), tras esto se realizaron deshidrataciones seriadas en etanol del 50, 80, 96% (3 minutos cada una) para que las células se fijaran al porta.

La permeabilización de las células Gram positivas (BL) requiere del uso de lisozima, ya que por ser su pared más dura que las de las Gram negativas, este tratamiento mejora la entrada de la sonda. Las concentraciones de lisozima ensayadas fueron 0, 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg mL^{-1} disueltas en tampón Tris-EDTA (100 mM Tris-HCl y 50 mM EDTA pH 8). La superficie de cada pocillo se cubrió con 10 μL de cada una de estas concentraciones a fin de estimar la concentración más adecuada para cada especie. Las temperaturas y los tiempos testados para la incubación con lisozima fueron 4°C durante 15, 20 y 30 min y temperatura ambiente (25°-28°C) durante 5 y 20 min. El tratamiento enzimático se finalizó mediante enjuagado de los portas con agua estéril destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Los

portas se deshidrataron mediante inmersión en diluciones seriadas 50, 80, y 96% de etanol (3 min en cada una) y posteriormente se dejó secar al aire.

Para evaluar la influencia de diferentes concentraciones de lisozima, temperaturas y tiempos de permeabilización e incubación y para analizar la eficiencia de la hibridación con las sondas diseñadas se utilizó la sonda Eub338 que hibrida con cualquier eubacteria (Beimfohr *et al.*, 1993). Esta sonda se marcó en el extremo 5' con fluoresceína y se utilizó como control positivo de la hibridación, mientras que la sonda Non338 marcada también con fluoresceína en el extremo 5' y complementaria a la sonda Eub338, se usó como control negativo para comprobar que no se producía ninguna unión inespecífica (Amann *et al.*, 1990a). También se analizó la influencia de la fase de crecimiento de la bacteria sobre la intensidad de fluorescencia utilizando para ello células en fase logarítmica y estacionaria de crecimiento.

3.2.3.3 Hibridación con una o múltiples sondas y montaje

Para la hibridación de las células con una única sonda se adicionaron 9 μL de tampón de hibridación (20 mM Tris-HCl pH 7.2-7.4, 0.9 M NaCl, 0.01% sodio dodecil sulfato (SDS)) y 1 μL de sonda marcada con fluorocromo (50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$). Se mezclaron tampón de hibridación y sonda en proporción 9:1 y se adicionó la mezcla a cada pocillo. En el caso de la hibridación con múltiples sondas se adicionó 1 μL de cada sonda marcada con fluorocromo (50 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) y se agregó tampón de hibridación hasta alcanzar un volumen final de 10 μL para cada pocillo

Los portas se colocaron en el interior de una cámara húmeda equilibrada con 1 M NaCl, y se incubaron a diferentes temperaturas y tiempos para establecer las condiciones óptimas de hibridación para cada una. Cada sonda se ensayó a la temperatura correspondiente a la T_m de la sonda con diferentes tiempos de incubación 2, 4, 6 horas y durante toda la noche. Además, como se pretendía realizar hibridaciones múltiples con varias sondas, se ensayó el efecto de varias temperaturas (50, 40 y 30°C) y diferentes tiempos de incubación de (2, 4, 6 horas y durante toda la noche) sobre la hibridación múltiple. Transcurrido el tiempo de hibridación, se eliminó la solución de hibridación y se aplicaron condiciones más restrictivas para la unión cambiando la concentración de sales del tampón de lavado (20 mM Tris-HCl pH 7.2, 0.9 M NaCl, 0.1% SDS), a fin de eliminar la sonda unida a los lugares no específicos. Los portas se sumergieron durante 15 min en 50 mL de tampón de lavado precalentado a una temperatura superior a la T_m en 5, 10 o 15°C más para facilitar la separación de las uniones no específicas

(lavado restrictivo). Se validaron estas condiciones consenso comparando los resultados obtenidos con los que se consiguieron usando las condiciones óptimas para cada especie. Se usaron tanto cultivos mixtos como puros de BL y BA aisladas en vino. Finalmente, los portas se enjuagaron abundantemente con agua destilada, se secaron al aire en oscuridad, y se montaron con Vectashield® Mounting Medium H-1000 (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, USA), poniendo una gota por debajo y otra por encima del cubre, antes de ser visualizados al microscopio de fluorescencia.

3.2.4 Hibridación en filtro

3.2.4.1 Aplicación de las muestras y permeabilización

Las muestras de medio de cultivo, mosto o vino se filtraron mediante el uso de una torre de filtración aplicando vacío < 250 mbar. Los filtros usados eran de policarbonato negro de 25 mm diámetro y de 0.2 µm de tamaño de poro (Isopore GTBP 2500 membranas; Millipore, Eschborn, Germany) (Glöckner *et al.*, 1996; Tuschak *et al.*, 1999). El volumen a filtrar se ajustó para conseguir un número adecuado de células sobre el filtro (10^4 - 10^6 céls cm⁻²). Las células se fijaron sobre el filtro cubriendo éste con 3 mL de PBS durante 3 min, se repitió la operación 2 veces eliminando el líquido anterior mediante vacío, posteriormente se adicionaron 3 mL de etanol 96% y se dejó secar el filtro durante 3 min a temperatura ambiente. Aquellas muestras que previamente se habían fijado en bodega mediante el procedimiento descrito en el punto 3.2.2, se filtraron posteriormente en el laboratorio.

Tras la fijación, las células se permeabilizaron con 200 µL de una solución de lisozima a la concentración óptima para cada especie, tras 5 minutos la solución se eliminó aplicando vacío, finalmente se lavó con agua destilada estéril para eliminar cualquier resto de lisozima. El tratamiento de permeabilización con lisozima se obvió cuando el objetivo fue la detección de BA en las muestras.

3.2.4.2 Hibridación y montaje

Los filtros secados al aire se pudieron almacenar a temperatura ambiente durante varias semanas sin que ello tuviese consecuencias negativas sobre la hibridación posterior. Cada filtro se cortó en varias secciones, colocándose cada una de ellas sobre un porta de vidrio. Cada sección se hibridó con diferentes sondas o combinaciones de varias de ellas. Las

secciones de filtro se cubrieron con la solución de hibridación descrita arriba, el volumen a usar dependió de la superficie de cada sección, así para un cuarto de filtro se usaron 100 μ L. Una vez aplicada la solución se incubó el filtro en una cámara húmeda equilibrada. Transcurrido el tiempo de hibridación a la temperatura adecuada, el filtro se transfirió a un vial con 50 mL de tampón de lavado previamente precalentado a temperatura de lavado más restrictiva (más alta), y posteriormente se incubó en flotación sin agitación durante 15 min. Transcurrido este tiempo los filtros o secciones de éste se enjuagaron con agua destilada, se secaron al aire y se montaron con una gota de Vectashield[®] aplicada debajo y encima del filtro.

3.2.5 Visualización al microscopio

La fluorescencia de las células se detectó con un microscopio de epifluorescencia Leica DMRB dotado con una lámpara de mercurio a alta presión de 100 W y bloques de filtros Leitz A (UV light exciter BP 340-380nm, beamsplitter RKP 400nm, emitter LP 430nm) para fluorocros visualizados en azul, I3 (blue light exciter BP 450-490nm, beamsplitter RKP 510nm, emitter LP 520nm) para fluorocromos de fluoresceína que producen una luz verde, y N2.1 (light exciter BP 515-560nm, beamsplitter RKP 580nm, emitter LP 580nm) para fluorocromos como la rodamina.

Las microfotografías se obtuvieron usando película a color Kodak Gold 800 ASA. Los tiempos de exposición usados fueron 0.10 a 0.30 segundos para microfotografías en contraste de fase y 10 a 150 segundos en epifluorescencia.

La visualización de hibridaciones dobles o triples requirió el uso de diferentes filtros; La captación de estas imágenes por microfotografía se realizó mediante doble o triple exposición de la película, en las condiciones más adecuadas para cada fluorocromo. Así para captar una hibridación marcada con fluoresceína, el tiempo de exposición (apertura de objetivo) fue de 10-30 s, mientras que para captar el marcaje con rodamina el tiempo fue más prolongado, unos 120 s y para Marina Blue unos 150 s.

Cuando se quiso realizar microfotografías de las hibridaciones múltiples se procedió a exponer el porta con la hibridación en el siguiente orden: con el filtro A durante un tiempo de

100-150 s, a continuación el filtro N2.1 durante 100-120 s y finalmente con el filtro I3 se procedió a un tiempo de exposición de 20-30 s.

3.2.6 Estimación de la pérdida de células durante la hibridación

Se estudió la pérdida de células durante el proceso de hibridación mediante recuento de tres secciones del mismo filtro o de dos portas conteniendo la misma muestra de tres especies de referencia *L. plantarum*, *Leuc. mesenteroides* y *L. brevis*.

Se hibridaron las muestras con Eub338 y con la sonda específica para cada especie y se comparó el resultado con el obtenido tras teñir las mismas muestras con DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol). La tinción con DAPI permite observar directamente las células teñidas sin necesidad de posterior manipulación, por ello se utilizó como control para comparar la posible pérdida de células que podría producirse durante la hibridación y lavados posteriores. Las secciones de los filtros se colocaron sobre un porta, una sección se cubrió con 30 μL solución DAPI (1 mg mL^{-1} en agua destilada) durante 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad, las otras secciones de filtro se hibridaron con el mismo volumen de solución de hibridación que contenía conteniendo la sonda Eub338 o la sonda específica de cada tipo de microorganismo. Después, las secciones de filtro fueron montadas como ha descrito anteriormente en el punto **3.2.4.2** y observadas al microscopio para su recuento.

La comparación de la pérdida de células durante la hibridación sobre portas gelatinizados se llevó a cabo cubriendo los pocillos que contenían a los microorganismos con 10 μL de solución DAPI (1 mg mL^{-1} en agua destilada) durante 5 min a temperatura ambiente en oscuridad. Otro porta conteniendo la misma muestra fijada se hibridó con la sonda Eub338 y con la sonda específica para cada microorganismo analizado. Ambos portas se montaron y visualizaron como ha sido descrito en los apartados **3.2.4.2** y **3.2.4.3**.

Los resultados se expresaron como porcentaje de células visualizadas por hibridación *in situ* frente a las visualizadas con DAPI, tanto en porta como en filtro. La media y desviación estándar se calcularon a partir del recuento de 20 campos elegidos al azar en cada sección de filtro o porta. Los porcentajes se obtuvieron mediante la relación entre el número obtenido usando fluorescencia y en número de células teñidas con DAPI en filtro o en porta.

3.3 Análisis de fragmentos de restricción del fragmento amplificado del gen ribosomal 16S: 16S-ARDRA

Se amplificó el gen ribosomal 16S de BA utilizando los cebadores pA y pH descritos por Edwards *et al.*, (1989). La amplificación del ADN se llevó a cabo en un volumen de 50 μL . La mezcla de reacción contenía 200 μM dNTPs, 1 μM de cada cebador, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 2 U de *Taq* polymerase (Invitrogen Technologies) y 1 μL de suspensión de células. La suspensión de células se consiguió cogiendo una colonia crecida sobre medio sólido y resuspendiéndola en 20 μL de agua destilada estéril. La amplificación para BA se llevó a cabo en un termociclador PTC-100TM (MJ Research). Las condiciones de amplificación para BA en cada ciclo comprendían una desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C seguida de 35 ciclos de amplificación que consistían en un paso de desnaturalización de 30 seg a 94 °C, anidamiento a 62 °C durante 30 s, y extensión a 72 °C durante 1 min. Las reacciones fueron completadas con 5 min de elongación a 72 °C seguido de enfriamiento 4 °C. Los productos fueron guardados a 4 °C hasta su utilización.

Para comprobar el resultado de la amplificación, se tomaron 10 μL de los productos amplificados y se resolvieron en geles de agarosa al 1.2% (p/v) SeaKem[®] LE agarosa (FMC, Rockland, ME, USA) en 0.5 x TBE. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Se utilizó 1 Kb Plus ladder (Gibco, BRL) como marcador de peso molecular. Las imágenes fueron digitalizadas con el sistema de captación de imagen GelPrinter Plus (TDI, Madrid, Spain). La restricción de los fragmentos amplificados se llevó a cabo en 20 μL de tampón de incubación (New England Biolabs) conteniendo 5 U de los enzimas de restricción (*AluI*, *BfaI* o *HaeIII*, por separado) y 2-10 μL del producto de PCR que contenía aproximadamente 300 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN. Las condiciones en las que se llevaron a cabo las digestiones fueron 37°C durante 2 horas. El producto de la digestión del 16S rADN se resolvió en geles de agarosa SeaKem[®] LE agarosa (FMC, Bioproducts) al 2.0% (w/ v) en 0.5x TBE y se usó 1 Kb Plus ladder (Gibco, BRL) como marcador de peso molecular. La tinción y digitalización de los geles se llevó a cabo como se ha descrito con anterioridad.

La identificación se llevó a cabo mediante análisis de semejanza entre los perfiles de los aislados y los obtenidos con cepas de referencia. Los perfiles se introdujeron en una base de

datos y fueron comparados mediante el programa BioNumerics de Applied-Biomath, utilizando el coeficiente de Dice y el método de agrupamiento UPGMA.

3.4 Desarrollo de cebadores específicos para identificación/detección del género *Acetobacter* y de algunas de sus especies.

Para identificar o detectar las especies de *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *G. oxydans*, *Ga. liquefaciens* y *Ga. hansenii* descritas habitualmente en el vino, se diseñaron cebadores específicos a partir de las secuencias del gen 16S rADN depositadas en GenBank usando los programas DNAMAN 4.03, Macaw y BLAST. También se diseñaron cebadores generales para cualquier especie perteneciente a la familia *Acetobacteraceae*. La lista de taxones para las cuales se diseñaron cebadores y los nombres de los cebadores fueron: *Acetobacteraceae* (AABf), *A. aceti* (Aacet), *A. pasteurianus/A. pomorum* (Apast), *G. oxydans* (Goxy), *Ga. hansenii* (Ghans), *Ga. liquefaciens* (Gliqu). El ADN molde de las cepas puras con las que se comprobó la especificidad de estos cebadores se obtuvo directamente a partir de una colonia.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de 50 μ L, la mezcla de PCR contenía 200 mM dNTPs, 1 mM de cada cebador de la pareja de cebadores (ver Figura 4), tampón 10 X (75 mM Tris-HCl (pH 9.0) 50 mM KCl, 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 2 mM MgCl_2 , 1 U de DNA polimerasa Biotools™ (B&M Labs, S.A.) y 1 μ L de suspensión celular, obtenida como ya se ha descrito en el apartado 2.3.

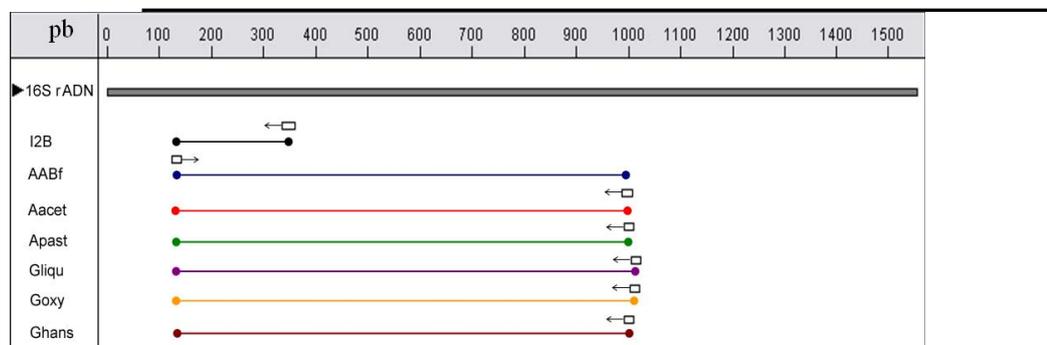


Figura 4. Lugares de unión de las parejas de cebadores, tamaño de los fragmentos amplificados, y sentido de la reacción de amplificación.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador PTC-100TM (MJ Research). Las condiciones de amplificación para cada pareja de cebadores se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de amplificación para las distintas parejas de cebadores.

Especificidad		<i>Acetobacteraceae</i>	<i>G. oxydans</i>	<i>A. aceti</i>	<i>A. pasteurianus</i>	<i>Ga. hansenii</i>	<i>Ga. liquefaciens</i>
Parejas de cebadores		AABf-I2B	AABf-Goxy	AABf-Aacet	AABf-Apast	AABf-Ghans	AABf-Gliqu
Desnaturalización inicial	Tª (°C)	94°C					
	Tiempo	5 min					
Desnaturalización	Tª (°C)	94°C					
	Tiempo	30 s					
Emparejamiento	Tª (°C)	60	63	58'5	59	61	55
	Tiempo	30 s	30 s	1 min	30 s	30 s	1 min
Extensión	Tª (°C)	72°C					
	Tiempo	1min					
Extensión final	Tª (°C)	72°C					
	Tiempo	10 min					

La especificidad de las parejas de cebadores de PCR se evaluó usando cultivos puros de cepas de referencia de los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Gluconacetobacter* previamente descritas en vinos y mostos. Además se utilizó *Acidomonas methanolica* perteneciente a la familia *Acetobacteraceae* para comprobar que la sonda general AABf-I2B era capaz de detectar a nivel de familia. Como control negativo se emplearon *Frateuria aurantia* relacionada previamente con la familia *Acetobacteraceae* (ya que su nombre original era *Acetobacter aurantium*) pero excluida actualmente de la familia *Acetobacteraceae*, y una BL perteneciente al género de *Lactobacillus* (*L. plantarum*).

3.4.1 Detección de bacterias acéticas en vino mediante PCR específica

Para la detección de BA directamente en muestras de vino, se procedió del siguiente modo:

Se diseñó una columna de filtrado para eliminar posibles agentes inhibidores de la PCR presentes en el vino (ver Figura 5). La columna de filtrado consistía en una jeringa de unos 10 mL de volumen que se rellenó con una primera fina capa de algodón (3 mm), sobre ella se agregó polivinilpirrolidona (PVP, Sigma) hasta alcanzar una altura de 3 cm, después se colocó otra fina capa de algodón (5 mm). Esta columna se esterilizó en autoclave antes del filtrado del vino.

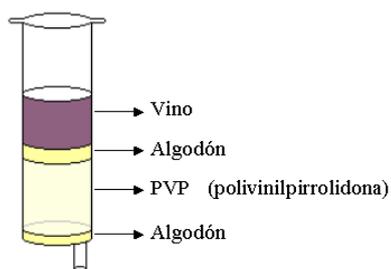


Figura 5. Columna de filtrado para vino.

Para comprobar la efectividad de la técnica de detección de BA por PCR, se utilizó un vino alterado con picado acético (A), un vino esterilizado por filtración sin inocular (B) y un vino esterilizado por filtración e inoculado con *G. oxydans* CECT 360, *A. aceti* (LMG1372) o *A. pasteurianus* (LMG 1553) a una concentración de 10^6 céls mL^{-1} (C). La filtración esterilizante del vino tinto se llevó a cabo filtrándolo a través de un filtro de nitrocelulosa (Millipore) de tamaño de poro $0,22 \mu\text{m}$. Se partió de un volumen original de vino de 50 mL de cada tipo de vino (A, B y C) de los cuales se tomaron distintos volúmenes, que se procesaron de cuatro diferentes formas (Ver esquema de la Figura 6):

- 1) PCR directa de $1 \mu\text{L}$ de vino con los cebadores AABf y I2B
- 2) Centrifugación de 1 mL de vino a 10000 rpm en una Minifuge (Heraeus) durante 2 minutos, lavado del sedimento con 1 mL PBS y centrifugación a 10000 rpm durante 2 minutos, resuspensión del sedimento en $20 \mu\text{L}$ de agua, y amplificación de $1 \mu\text{L}$ de la suspensión con los cebadores descritos previamente.
- 3) Filtración de 2 mL de vino a través de la columna de PVP y amplificación de $1 \mu\text{L}$ del filtrado en las condiciones anteriores.
- 4) Filtración de 2 mL de vino a través de la columna de PVP, centrifugación del filtrado, y resuspensión del sedimento en $20 \mu\text{L}$ de agua. A continuación se realizó la amplificación en las condiciones ya descritas.

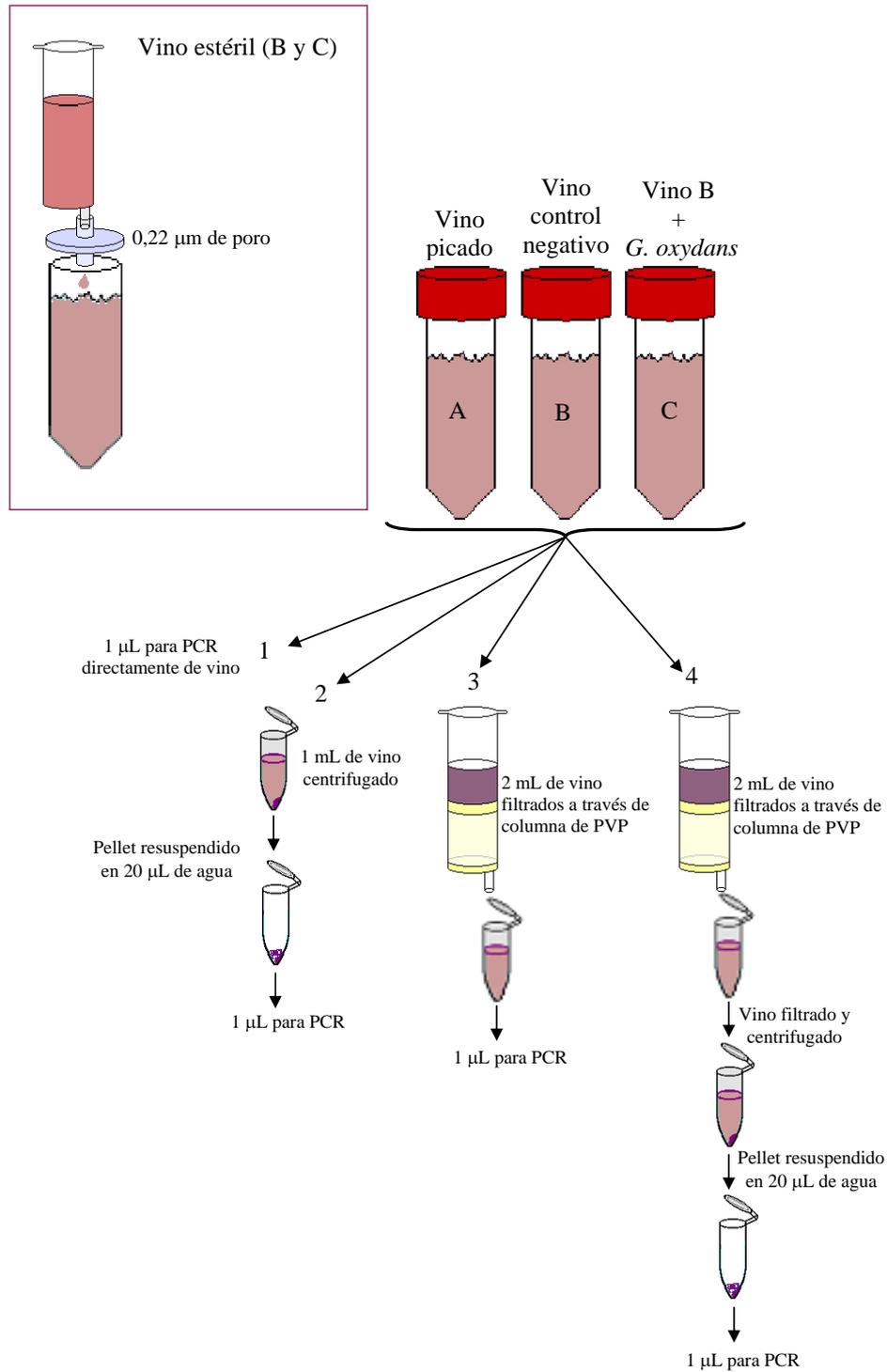


Figura 6. Descripción del origen de las muestras analizadas y del modo de proceder para obtener el ADN molde en este experimento.

- A) Vino picado:
- A1: PCR de la muestra directa
 - A2: PCR de la muestra centrifugada y sedimento resuspendido
 - A3: PCR de la muestra filtrada con la columna de PVP
 - A4: PCR de la muestra filtrada con la columna de PVP, posteriormente centrifugada y sedimento resuspendido
- B) Vino filtrado sin inocular (control negativo)
- B1: PCR de la muestra directa
 - B2: PCR de la muestra centrifugada y sedimento resuspendido
 - B3: PCR de la muestra filtrada con la columna de PVP
 - B4: PCR de la muestra filtrada con la columna de PVP, posteriormente centrifugada y sedimento resuspendido
- C) Vino filtrado inoculado con una población de 10^6 céls mL⁻¹ de *G. oxydans*
- C1: PCR de la muestra directa
 - C2: PCR de la muestra centrifugada y sedimento resuspendido
 - C3: PCR de la muestra filtrada con la columna de PVP
 - C4: PCR de la muestra filtrada con la columna de PVP, posteriormente centrifugada y sedimento resuspendido

Para incrementar el poder de detección en la amplificación directa del vino se realizó una PCR anidada o “nested PCR” (ver Figuras 7 y 8). Para evaluar la utilidad de este método en la detección de BA del vino se inocularon varios vinos previamente esterilizados por filtración, tal y como que se describió con anterioridad, y se inocularon con poblaciones aproximadamente de 10^6 céls mL⁻¹ de *G. oxydans* (CECT 316^T). Para determinar el **umbral de detección** de esta técnica mediante este protocolo se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) del vino inoculado con *G. oxydans*. De cada una de las diluciones y de la muestra directa se tomó 1 µL para la realización de una PCR directa tal cual se describe en el apartado 3.4 de Material y Métodos, y 1 µL de la suspensión obtenida tras centrifugar 1 mL de muestra (5 minutos a 10000 rpm) y resuspender el sedimento en 20 µL de agua. De los productos de las primeras reacciones de PCR se tomó 1 µL y se realizó una segunda reacción de PCR en las mismas condiciones que la primera PCR (denominada PCR anidada). Para comprobar la cantidad de células que podía detectarse mediante la técnica de PCR directa y anidada (umbral de detección) se realizó un recuento de células en cámara Thoma y un recuento de viables, sembrándose 100 µL de las muestras originales y de las diluciones en placa de medio sólido.

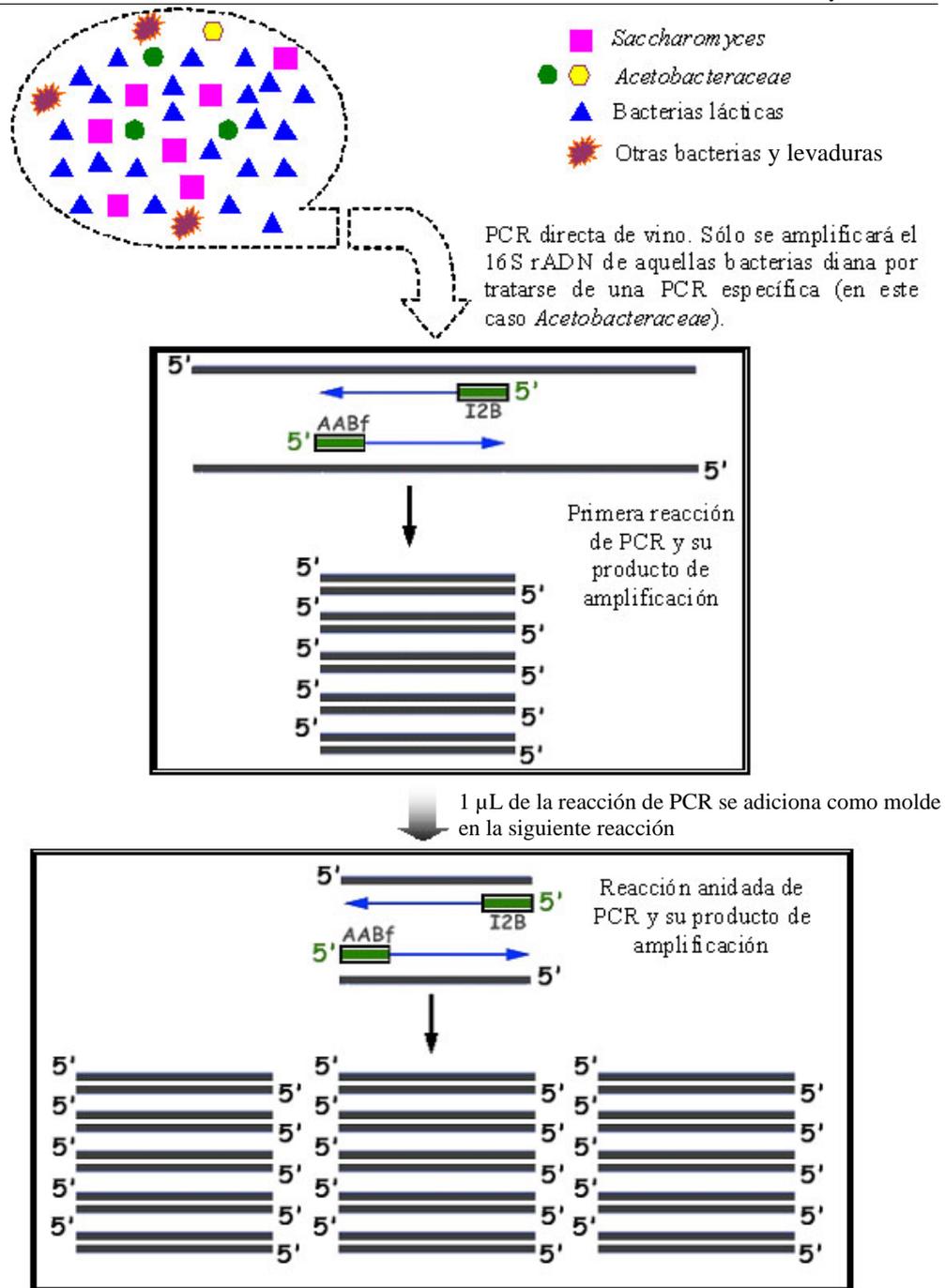


Figura 7. PCR anidada. En el caso que sólo deseemos detectar la población total de BA (*Acetobacteraceae* totales) es suficiente hacer una PCR con los cebadores AABf-I2B. Para incrementar el límite de detección se puede realizar una PCR anidada, es decir una PCR a partir del producto de amplificación obtenido en la primera PCR.

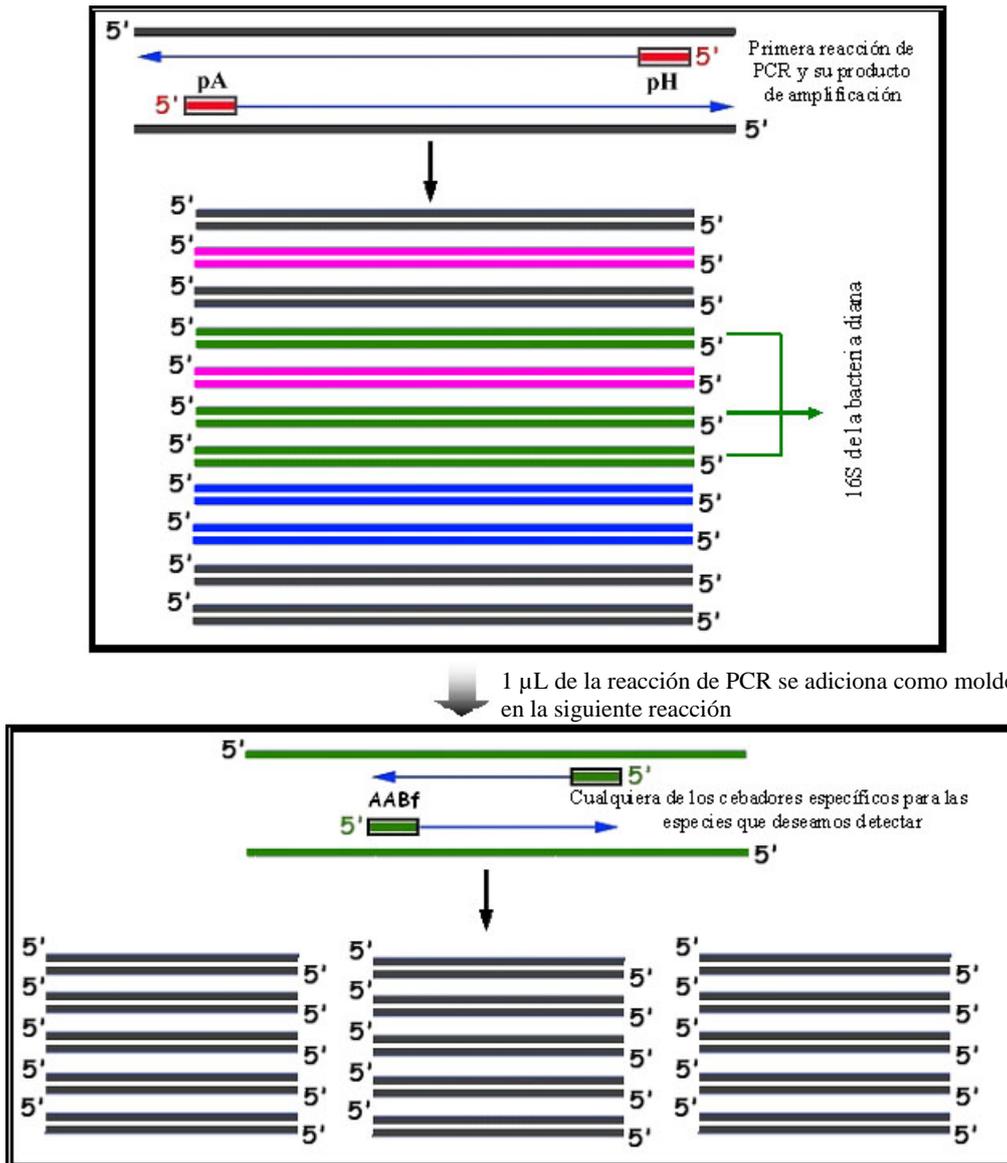


Figura 8. PCR anidada. En el caso de desear detectar una especie concreta de BA en el vino, se puede realizar una PCR que amplifique un gen existente en todas las bacterias, el 16S rADN, de modo que si la población originaria es pequeña el ADN de la misma se aumentará ligeramente. Después se puede realizar una PCR anidada a partir del producto de la primera, con lo cual utilizando cebadores específicos amplificaremos aquel ADN de la especie diana a detectar.

Para visualizar los productos obtenidos de la de la amplificación por PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. En cada pocillo se cargó un volumen de 10 μL (8 μL de muestra + 2 μL de tampón de carga) y 5 μL de 1Kb Plus (Invitrogen) como marcador de peso molecular, en un gel de agarosa 1 % (p/v) en TBE 1X. La electroforesis se realizó en tampón TBE 1X durante 30 min a 100 V, y posteriormente el gel se tiñó en baño de bromuro de etidio. La imagen del gel se capturó del mismo modo descrito en el punto 3.3.

3.5 Secuenciación del gen 16S rADN

En el caso de algunos aislados se recurrió a la secuenciación del gen 16S rADN. Para ello se amplificó este gen como se ha descrito previamente en el punto 2.3. Los productos de amplificación se purificaron utilizando el kit “UltraClean PCR clean up” (MoBio) y se secuenciaron en un secuenciador automático ABI-PRISM 377 (PE_Applied Biosystems), utilizando el kit de secuenciación “ABI Prism BigDye Terminador cycle sequencing ready reactin kit” (PE_Applied Biosystems). Los cebadores utilizados se describen en la tabla 5 y se muestra su posición en la Figura 9. Se obtuvieron así 4 secuencias que se alinearon y fundieron dando lugar a una secuencia consenso del gen ribosomal 16S; entonces se realizó un BLAST con cada una de las secuencias obtenidas para adscribir los aislados a especie.

Tabla 5. Cebadores utilizados para la secuenciación del gen 16S

Cebador	Secuencias 5'→3'	
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Edwards et al., 1989
pH	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	
S1-d	ACTACCAGGGTATCTAA	Este trabajo
S2-i	TGTGGAATTCACAGTGT	

SECUENCIACIÓN 16S rADN

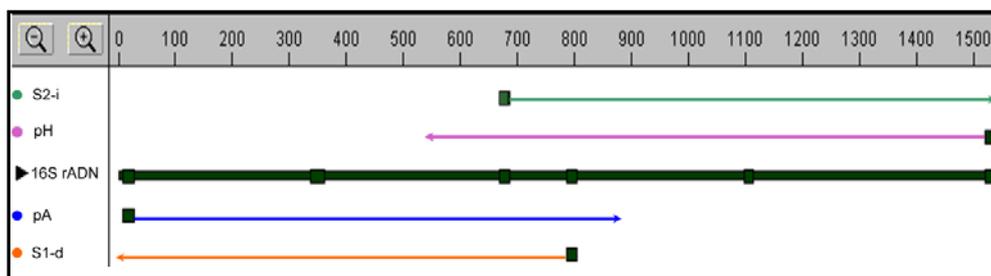


Figura 9. Esquema de las posiciones de los cebadores utilizados en secuenciación en el 16S rADN.

3.6 Estimación de la viabilidad de las células en las muestras

Se utilizó el kit DEAD/LIVE BacLight[®] para cuantificar las bacterias vivas y muertas presentes en las muestras. Este ensayo se basa en la tinción del ADN de células. El kit de viabilidad para bacterias LIVE/ DEAD BacLight[®] es un método de tinción doble. En este proceso, las células son tratadas con dos colorantes de unión al ADN: SYTO9 e Ioduro de Propidio (PI). SYTO9 difunde a través de la membrana celular intacta y se une al ADN celular, mientras que PI sólo es capaz de penetrar en células de membrana dañada y una vez dentro se une al ADN. Este método de tinción dual permite la efectiva separación entre células viables y muertas. La viabilidad de las células se estima de acuerdo al número de células coloreadas en verde (vivas) divididas por la suma de las células coloreadas de verde y rojo (muertas), expresada en tanto por ciento.

Para estimar la viabilidad celular en las muestras, se recogieron 50 µL de muestra, a los que se adicionaron 950 µL de agua estéril filtrada, se centrifugaron a 13000 rpm durante 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con 1 mL de agua estéril. Tras el segundo lavado se resuspendieron las células en 1 mL de agua estéril y filtrada, se añadieron 3 µL de la mezcla de los reactivos del kit SYTO9/PI en proporción 1:1 y se mantuvo la solución en oscuridad durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se filtraron las bacterias a través de un filtro de policarbonato de 25 mm de diámetro para proceder a su visualización y a su recuento, con microscopio de epifluorescencia.

Para comprobar que no se perdían células se realizó una tinción de una sección del mismo filtro teñido con 100-200 µL de DAPI a una concentración 50 µg mL⁻¹.

Los estudios de estimación de la viabilidad de las bacterias en vinos se realizaron durante las experiencias a nivel industrial llevados a cabo en la Cooperativa Vinícola de de Ontinyent (Valencia), que se describen a continuación en el punto **3.7.1**.

3.7 Aplicación de las técnicas desarrolladas para el seguimiento de bacterias lácticas y acéticas en muestras naturales

3.7.1 Estudio de la evolución de las población de BA durante una vinificación industrial

Se realizó el seguimiento de la microbiota acética durante la vinificación en tinto de dos lotes de 45 hectolitros de mosto (A y B) que contenía proporciones variables de distintas uvas (90% Tempranillo 5% Garnacha y 5% otras variedades mezcladas). La vinificación se realizó en condiciones industriales en la Cooperativa Vinícola de Ontinyent (Valencia). El llenado del tanque A se inició antes que el del B. En ambos casos se añadieron 8.1 mg L⁻¹ de SO₂. En el momento de la toma de muestras las características del mosto fueron pH 3.44 y densidad (D_{20/20}) de 1050 en el caso del tanque A y pH 3.53 y densidad 1090 en el caso del tanque B. Tras 96 horas de fermentación desde el inicio de llenado del tanque A, se realizó un descubado en ambos depósitos, mezclándose a partes iguales los vinos de los tanques A y B en un nuevo tanque C de 90 HL, donde el vino se mantuvo por un periodo de 30 días hasta que realizase la FML

Se tomaron muestras de vino inmediatamente tras el remontado, todos los días durante la FA en los tanques A y B, y días alternos durante la FML en el tanque mezcla C (ver Figura 10). En estas muestras se estimó la concentración de las bacterias presentes en los distintos momentos de la vinificación mediante recuento en placa según se describe en el apartado **3.1.2**, y con el kit de viabilidad LIVE/DEAD BacLight[®]. Igualmente, se analizaron todas las muestras del depósito C mediante FISH usando la sonda específica (AABr) para *Acetobacteraceae* y las sondas desarrolladas para especies de BA, lo cual nos permitió estimar el número de células totales de BA y las pertenecientes a diferentes especies (ver Figura 8). La identificación de los aislados crecidos sobre medio sólido se realizó por PCR específica, utilizando los cebadores descritos en la Tabla 4, 16S-ARDRA y FISH.

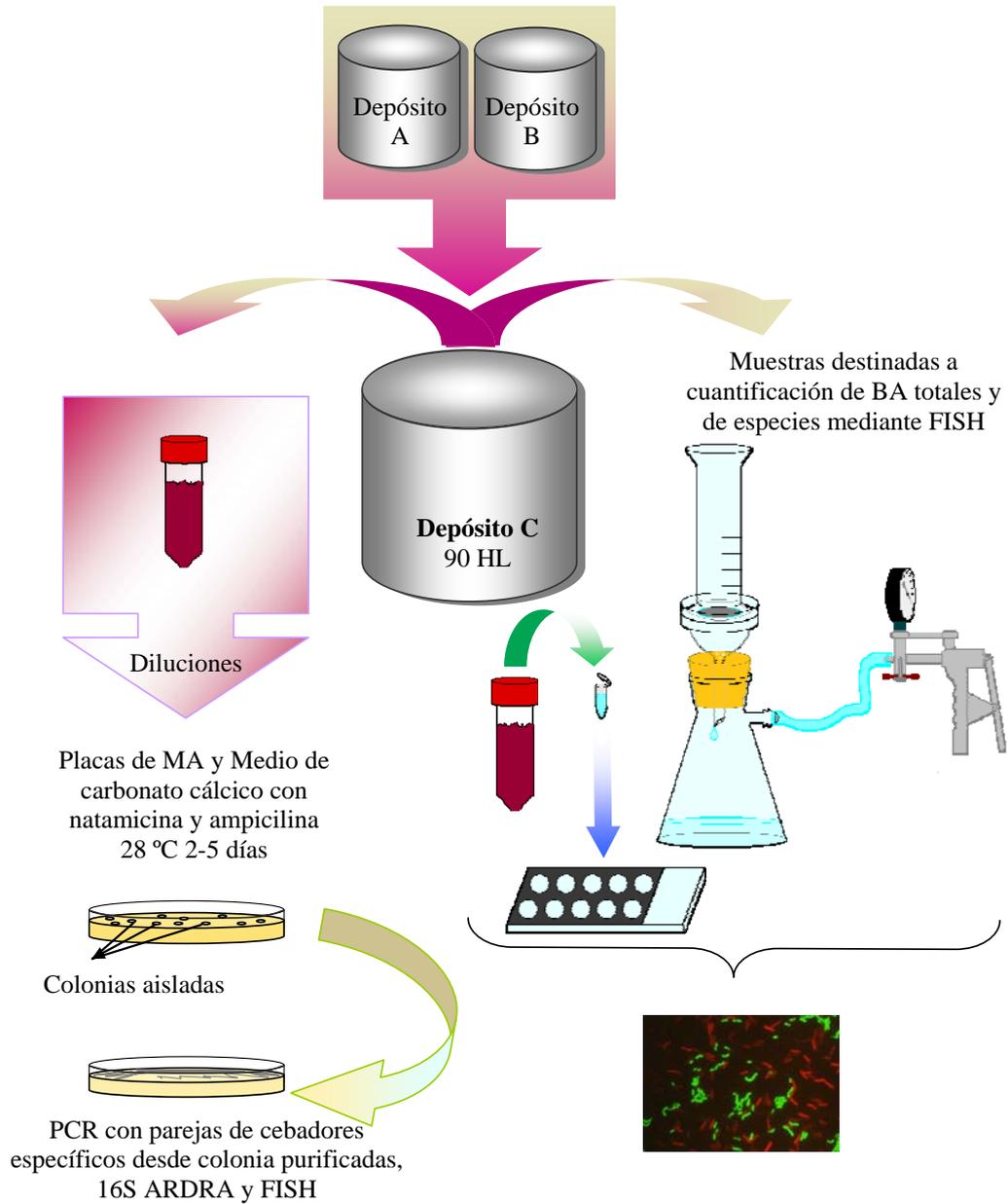


Figura 10. Representación del método seguido para el seguimiento de la población de BA durante la vinificación en Ontinyent.

3.7.2 Estudio de la dinámica de poblaciones de BL y BA en vinificaciones piloto

Se realizaron una serie de experiencias que tenían por objeto conocer el efecto que ejercían distintas prácticas enológicas sobre la evolución de las poblaciones naturales o inoculadas y sobre el tiempo de inicio de la FML. Se utilizaron uvas de la variedad Tempranillo. Las variables ensayadas fueron: tiempo de maceración del mosto con los hollejos durante la FA, FML en presencia/ausencia de lías de levaduras, e inoculación o no con cultivos malolácticos.

Las vinificaciones se realizaron a escala piloto en depósitos de acero inoxidable de 400, 200 y 100 L y en garrafas de cristal de 30 L en las instalaciones de la planta piloto del Instituto Catalán de Vino en Reus (INCAVI, Tarragona). Se partió de 400 L de mosto de la variedad Tempranillo, este volumen se dividió en dos lotes de 200 L que se colocaron en dos tanques de acero inoxidable (tanques 7 y 8) que constituyeron dos réplicas del experimento. El volumen del depósito 7 se dividió en dos lotes de 100 L denominados con las siglas 7P y 7T (Figura 11). En el primero se llevó a cabo una maceración parcial con hollejos de 4 días, mientras que en el segundo se realizó una maceración total hasta que finalizó la FA (8 días). Una vez acabada la fermentación, el vino de ambos depósitos se dividió en lotes de 30 L que se colocaron en garrafas de cristal donde realizaron la fermentación maloláctica a 20-22 °C en distintas condiciones experimentales. A 30 L del vino procedente del tanque 7P se le eliminaron las lías y se les denominó con las siglas 7PN, y a otros 30 L se les dejó con ellas denominándose 7PL. En ambos casos se dejó que la FML se realizase de forma espontánea. Los 100 L procedentes del depósito 7T se distribuyeron en tres garrafas de 30 L. En dos de los lotes se eliminaron las lías, mientras que en el otro se mantuvieron (7TL).

En uno de los lotes en los que se eliminaron las lías se inoculó un cultivo comercial de *O. oeni*: Lactobacter (Laffort, S.A.) a la concentración y condiciones indicadas por el proveedor (7TN'), mientras que al otro lote se le dejó realizar la FML de forma espontánea (7TN). Se obtuvieron con ello 5 tipos de vinos diferentes en función de las distintas condiciones de vinificación aplicadas. Estos vinos tuvieron sus réplicas a partir del depósito 8: 8PN, 8PL, 8TL, 8TN y 8TN'.

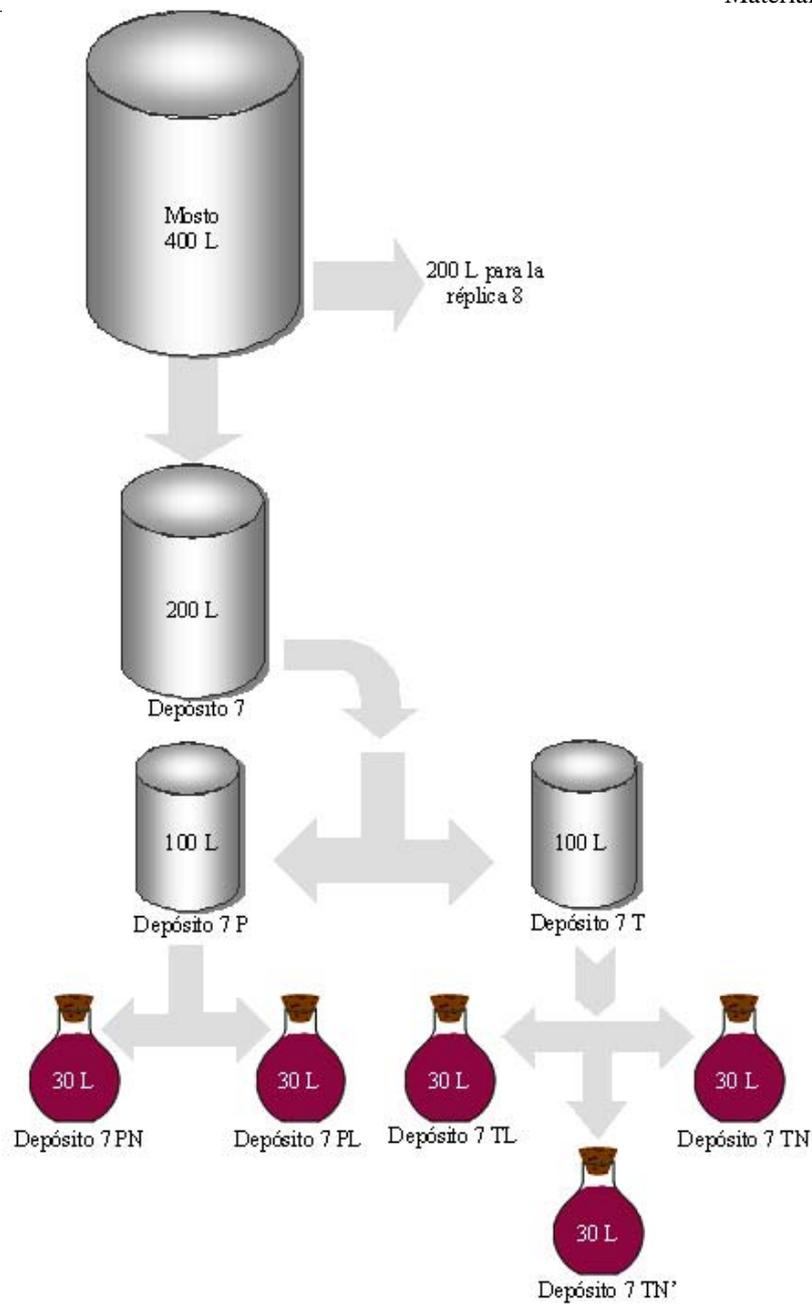


Figura 11. Esquema del procedimiento de vinificación en planta piloto del INCAVI (Reus). P: maceración parcial; PN maceración parcial y FML sin contacto con las lías y sin inóculo comercial; PL: maceración parcial y FML espontánea en contacto con lías; T: maceración total; TL: maceración total y FML espontánea en contacto con lías; TN: maceración total y FML espontánea sin contacto con lías; TN': maceración total y FML inducida mediante inóculo comercial sin contacto con lías.

En todos los casos se llevó a cabo el seguimiento de las poblaciones de BL y BA mediante recuento de viables en placa de MRSm y MLO con natamicina y MA con natamicina y ampicilina. Para el recuento de viables en placa se sembraron las muestras en los medios y condiciones descritos para el aislamiento de BL y BA en los apartados **2.1.1** y **2.1.2** (ver Figura 12). Tras observar su morfología y determinar su carácter Gram + o Gram – y la posesión o no de actividad catalasa para confirmar si pertenecían al grupo de las BL o de las BA, se llevó a cabo su identificación a nivel de especie. La identificación de las colonias aparecidas sobre los medios de aislamiento se llevó a cabo mediante 16S-ARDRA en el caso de BA y se confirmó posteriormente mediante PCR específica utilizando las parejas de cebadores descritas en el apartado **2.4** (Tabla 4) y FISH de los aislados en porta. En el caso de BL se realizó identificación de las colonias aparecidas en placa mediante FISH. Paralelamente se realizó el recuento y la identificación directa de las especies existentes en los vinos mediante FISH. Las muestras se fijaron en filtro siguiendo la metodología descrita en los apartados **3.2.2**, **3.2.3** y **3.2.4** (ver Figura 12), siguiendo en cada caso el protocolo de fijación y permeabilización de BL o BA. Se utilizaron sondas marcadas con fluorocromos distintos para las diferentes especies de BL y BA, y la sonda AABf para el recuento de BA totales. Se tomaron muestras de mosto, a mitad y final de la FA y a mitad y final de la FML. Se realizó el seguimiento de la evolución de la FA mediante la medida de la densidad ($D_{20/20}$) del mosto utilizando una serie de aerómetros calibrados. Igualmente se siguió la evolución de la temperatura a lo largo de la misma. La evolución de la FML se realizó cuantificando el ácido málico mediante HPLC (Frayne, 1986)

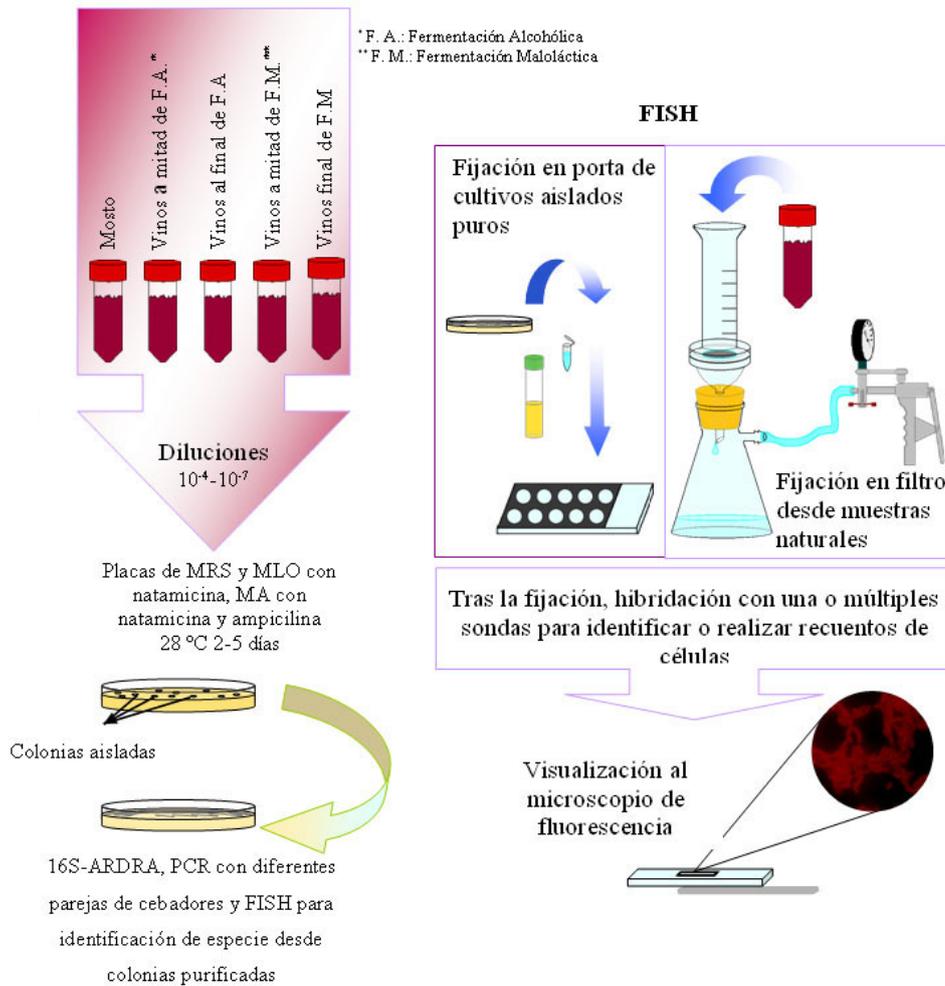


Figura 12. Procedimiento seguido para el análisis de poblaciones de BL y acéticas en las vinificaciones realizadas a escala piloto en el INCAVI de Reus.

3.7.3 Estudio de la evolución de las poblaciones de BL y BA en vinificaciones de laboratorio para evaluar el efecto del SO₂ sobre las mismas

Este estudio se llevó a cabo para poder evaluar si la concentración de sulfuroso tenía efectos importantes sobre la composición poblacional bacteriana durante la FA y la FML. Para llevar a cabo este objetivo se utilizaron uvas de la variedad Tempranillo proporcionadas por el INCAVI (de la misma cosecha que las utilizadas en la vinificación en planta piloto

apartado de Material y Métodos **3.7.2**). Las uvas se estrujaron manualmente en el laboratorio, obteniéndose tres lotes de 2250 mL de pasta estrujada, con los que se llevaron a cabo 3 vinificaciones en condiciones de laboratorio y con la microbiota propia de las uvas. Al primer lote (control), no se le adicionó metabisulfito potásico ($K_2S_2O_5$), al segundo se le añadieron 140 mg L^{-1} y al tercero 300 mg L^{-1} lo que equivalía a la mitad de la concentración para SO_2 . Se tomaron muestras de cada uno de las vinificaciones a diferentes tiempos: en el mosto estrujado antes de la adición de $K_2S_2O_5$, 1'5 h tras su adición, y luego diariamente durante la FA (duración 7-8 días) y cada 2 días hasta final de la FML. Estas muestras se sembraron en MRSm y MLO con natamicina para el aislamiento de BL, y en MA con natamicina y ampicilina para el aislamiento de BA, y se incubaron en las condiciones que se especifican en el apartado **3.1.1** y **3.1.2**. Una vez crecidas las colonias se realizaron los recuentos de BL y BA. Para seguir la evolución de las especies se llevó a cabo un recuento de los diferentes tipos morfológicos aparecidos sobre las placas, se aislaron y se identificaron mediante 16S-ARDRA, PCR específica y FISH. Además se realizó la población de BA totales sobre el vino control mediante FISH con la sonda AABr. El seguimiento de la fermentación alcohólica se llevó a cabo mediante la medida de la densidad ($D_{20/20}$) con un conjunto de areómetros calibrados. Igualmente, se analizó la evolución de la temperatura a lo largo de la misma. Se analizó el pH y la acidez total al principio y al final de las vinificaciones. La acidez total se cuantificó en g L^{-1} expresado como ácido tartárico, siguiendo los métodos oficiales (Anónimo 1999).

4. Resultados y discusión

4.1. FISH (Fluorescent *in situ* hybridization)

4.1.1 Diseño de sondas

Como se mostró en el apartado de Materiales y Métodos 3.2.1, el diseño de sondas se centró en las regiones variables V1, V2 y V6 del ADN ribosomal del 16S. En la Tabla 6 se muestran las secuencias elegidas tras los correspondientes alineamientos

Tabla 6. Secuencias de las sondas diseñadas y microorganismos diana.

Sondas	Secuencia (5' → 3')	Especificidad	Diana ^a	Referencia
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Eubacteria	338-355	[Amann <i>et al.</i> , 1990a]
Non338	ACTCCTACGGGAGGCAGC		ninguna	[Manz <i>et al.</i> , 1993, Wallner <i>et al.</i> , 1993]
Bacterias lácticas				
Lplan	CCAATCAATACCAGGAGTTCG	<i>L. plantarum</i>	66-85	[Hensiek <i>et al.</i> , 1992]
Lu2	GATCCATCTCTAGGTGACGCCG	Género <i>Leuconostoc</i>	221-242	[Nissen <i>et al.</i> , 1994]
Ppe	CGAACTTCCGTTAATTGATTAT	<i>P. pentosaceus</i>	69-90	[Mora. <i>et al.</i> , 1997]
Lbrev	CATTCAACGGAAGCTCGTTC	<i>L. brevis</i>	64-83	Este trabajo
Lcoll	CTTGATTTAACGGGATG	<i>L. collinoides</i>	68-84	
Lcory	GCTTCGGTCGACGTCAGT	<i>L. coryniformis</i>	70-88	
Lfarc	AGCTTCAATCTTCAGGAT	<i>L. farciminis</i>	72-92	
Lhilig	CAACTTCATTGACCAAGACGCG	<i>L. hilgardii</i>	67-88	
Lmali	AAGCATTGRTGAAAGTTTTCG	<i>L. mali</i>	70-90	
Lpara	GTTCCATGTTGAATCTCGG	<i>L. casei</i> ^b , <i>L. paracasei</i>	94-113	
Lzeae	TTCATCGACCAAACTC	<i>L. zeae</i> , <i>L. casei</i> ^c	66-83	
Ooeni	TAGTCATTGCTCACTTCACCCGAA	<i>O. oeni</i>	87-111	
Pdamn	GTTGAAATCATCTTCGA	<i>P. damnosus</i>	73-90	
Pparv	CTAAAATCATCTTCGGTGCAAGCAC	<i>P. parvulus</i>	65-90	
Bacterias acéticas				
AABf	CACCCGTGGATAGATCCCT	Familia <i>Acetobacteraceae</i>	125-143	Este trabajo
Aacet	TACAGCTCTCCATACAAG	<i>A. aceti</i>	989-1007	
Apast	CCAGCCCAACCTGATG	<i>A. pasteurianus</i> / <i>A. pomorum</i>	992-1010	
Goxy	GGTCCATCTCTGAACCGGT	<i>G. oxydans</i>	1003-1021	
Ghans	GACACAGCCTCCGCATGT	<i>Ga. hanseni</i>	993-1010	
Gliqu	TACCCATCTCTGGATA	<i>Ga. liquefaciens</i>	1007-1022	

^a El número indica la posición homóloga en el 16S rARN *E. coli*; ^b ATCC 334 ; ^c CECT 475^T

4.1.2 Optimización de las condiciones de permeabilización e hibridación

La optimización de las condiciones de permeabilización e hibridación se llevaron a cabo en porta utilizando la sonda universal Eub338, cuya secuencia le permite hibridar con cualquier eubacteria. Los resultados obtenidos al ensayar distintas concentraciones de lisozima mostraron que las más adecuadas para cada especie son las que aparecen en la Tabla 7. Como puede apreciarse la concentración varía entre las distintas especies, así para *O. oeni* y *L. mali* la concentración adecuada fue 0.1 mg mL^{-1} , mientras que para *L. brevis* y *L. hilgardii* se necesitaron 10 mg mL^{-1} , aunque para la mayoría de las especies fue suficiente con 1 mg mL^{-1} (Tabla 7). Estas variaciones en las concentraciones óptimas de lisozima para permeabilizar las células responden a la distinta resistencia de las paredes celulares de las bacterias. En el caso de las BA, que tienen una pared celular de naturaleza Gram -, y por ello mucho más débil que las de las BL (Gram +), la menor concentración de lisozima ensayada 0.1 mg mL^{-1} provocó la lisis completa de las células. Por esta razón, no se empleó lisozima para permeabilizar a las BA. Los tiempos de incubación para la adecuada permeabilización dependieron de la temperatura. Los mejores resultados se consiguieron con 20 minutos a 4°C , o 5 minutos a temperatura ambiente ($22\text{-}25^{\circ}\text{C}$). Se eligió esta última condición de incubación con lisozima para reducir el tiempo necesario para llevar a cabo el experimento.

Tras ensayar distintas temperaturas y tiempos de hibridación se establecieron cuales eran óptimas para cada especie y sonda (Tabla 7). Los tiempos de hibridación variaron desde 2 h para la Eub338 y Non338, a 4 h para la mayoría de sondas. Para las sondas Ppe, Pdamn y Ooeni los mejores resultados se obtuvieron después de 16 h de incubación con la sonda. También se ensayaron diferentes tiempos y temperaturas de lavado para eliminar cualquier posible unión inespecífica de las sondas, mostrándose en la Tabla 7 los más adecuados para cada sonda. En la Figura 13 y 14 se muestran imágenes de hibridaciones de algunos cultivos puros de cepas de referencia de BL y BA.

Tabla 7. Condiciones óptimas de hibridación para diferentes especies de BL y BA

Sondas	Diana	Concentración de lisozima	Temperatura (°C)		Tiempo de hibridación (h)
			Hibridación ^a	Lavado (10 min)	
Bacterias lácticas					
Eub338	Eubacteria	Dependiendo de la especie	45	48	2
Non338	Ninguna		45	48	
Lplan	<i>L. plantarum</i>	1 mg mL ⁻¹	40	48	4
Lu2	<i>Leuconostoc</i>		45	49	
Ppe	<i>P. pentosaceus</i>		50 ^b ; 28	30	
Lbrev	<i>L. brevis</i>	10 mg mL ⁻¹	42	45	4
Lcoll	<i>L. collinoides</i>	1 mg mL ⁻¹	42	33	
Lcory	<i>L. coryniformis</i>		40	45	
Lfarc	<i>L. farciminis</i>		30	35	
Lhilg	<i>L. hilgardii</i>	10 mg mL ⁻¹	46	49	
Lmali	<i>L. mali</i>	0.1 mg mL ⁻¹	37	42	
Lpara	<i>L. paracasei</i>	1 mg mL ⁻¹	35	40	
Lzeae	<i>L. zeae</i>		40	42	
Ooeni	<i>O. oeni</i>	0.1 mg mL ⁻¹	52	57	16
Pdamn	<i>P. damnosus</i>	1 mg mL ⁻¹	40	45	
Pparv	<i>P. parvulus</i>		44	47	4
Bacterias acéticas					
AABf	<i>Acetobacteraceae</i>	0 mg mL ⁻¹	40	43	4
Aacet	<i>A. aceti</i>		40	43	
Apast	<i>A. pasteurianus</i>		40	43	
Goxy	<i>G. oxydans</i>		45	48	
Ghans	<i>Ga. hanseni</i>		40	43	
Gliqu	<i>Ga. liquefaciens</i>		38	41	

^a Temperatura óptima para obtener la mayor señal de hibridación.

^b Temperatura de prehibridación

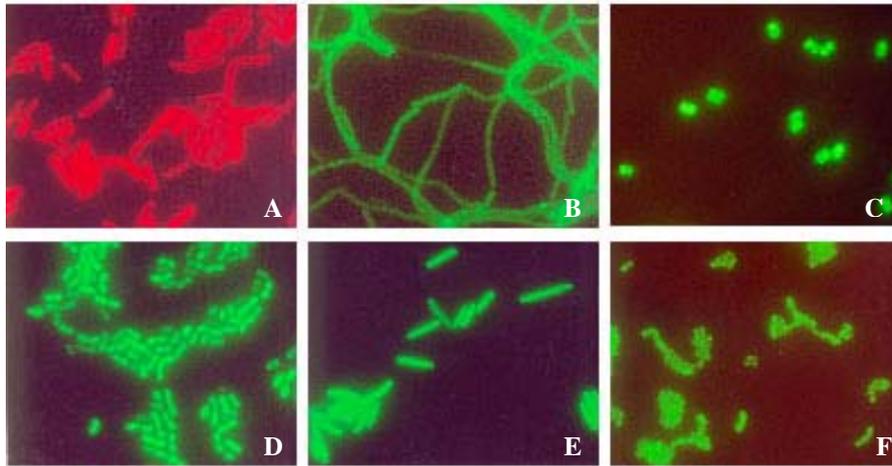


Figura 13. Algunas imágenes de células en cultivo puro hibridadas con sondas específicas. A) *L. plantarum* CECT 748^T, B) *L. casei* CECT 334, C) *P. parvulus* CECT 813^T, D) *L. mesenteroides* CECT 219, E) *L. brevis* CECT 216, F) *O. oeni* CECT 217^T.

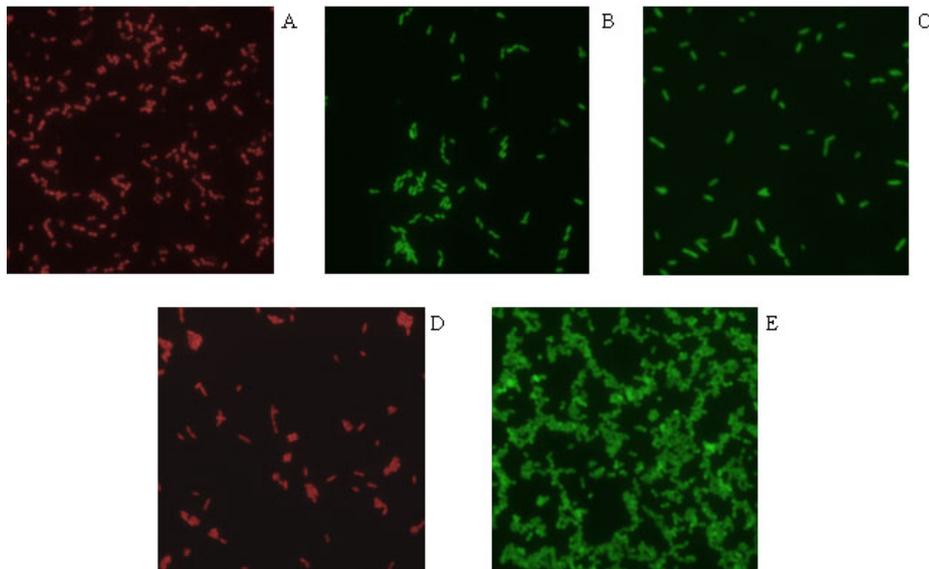


Figura 14. Imágenes de células de BA en cultivo puro hibridadas con sondas específicas. A) *Acetobacter pasteurianus* DSM 3509^T, B) *Acetobacter aceti* CECT 298^T, C) *Gluconobacter hansenii* DSM 5602^T, D) *Gluconobacter liquefaciens* DSM 5603 y E) *Gluconobacter oxydans* CECT 360T

4.1.3 Especificidad de las sondas

La especificidad de las sondas se evaluó realizando experimentos de hibridaciones cruzadas en porta entre microorganismos de referencia tal y como se define en el apartado **3.2.3**: 34 cepas de 24 especies diferentes de BL y 34 cepas de 18 especies diferentes de BA. Los resultados de los ensayos de especificidad de las sondas se muestran en la Tabla 7 para BL, y en la Tabla 8 para BA. Se tuvo en cuenta que falsos negativos o señales pobres podían ser consecuencia bien de un reducido número de dianas, bien de una insuficiente accesibilidad de la sonda (Amann *et al*, 1995) por una escasa permeabilización de las células (Beimfohr *et al*, 1993) o bien debido a la formación de posibles estructuras secundarias del gen ribosomal 16S que podría impedir el acceso adecuado de las sondas, aunque estas en nuestro caso ya se desarrollaron teniendo en cuenta la buena accesibilidad a todas las secuencias diana.

Se demostró que se conseguía una fluorescencia más intensa cuando se trabajaba con cultivos recogidos en fase exponencial. Ello es debido a que el contenido celular de rARNs es más elevado y por tanto la fluorescencia fijada sobre ellos mayor y por eso las células son más fácilmente detectables.

Ninguna de las especies de BL o BA ensayadas mostró autofluorescencia y la señal de hibridación fue intensa en todos los casos cuando se trabajó en las condiciones óptimas.

Como se puede apreciar en las Tablas 8 y 9, la sonda universal Eub (control positivo) dio señal positiva con todas las BL y BA ensayadas, mientras que la Noneub (control negativo) no dio con ninguna. La sonda LU2 específica para el género *Leuconostoc* dio señal positiva con todas las especies de este género, pero no con ninguna otra de otros géneros, lo que ratifica su utilidad para detectar células pertenecientes al género *Leuconostoc*, incluso para especies que no se han descrito en el vino. El resto de sondas desarrolladas sólo daban señal de hibridación con sus especies dianas correspondientes, con las únicas excepciones aparentes de las sondas de Lpara y Lzeae. La sonda Lpara hibrida con with *L. casei* ATCC 334 y *L. paracasei* subsp. *paracasei* CECT 4022, pero no con *L. casei* CECT 475^T (ATCC 393^T). Además, la sonda Lzeae hibrida con *L. zae* ATCC15820 y *L. casei* CECT475^T. Este resultado aparentemente anómalo refleja los problemas taxonómicos del grupo *L. casei*. Hay evidencias genotípicas de que las cepas ATCC 393^T y ATCC 15820 son miembros del mismo taxón (Diancourt *et al.*, 2007). Dellaglio *et al*, (2002) propusieron a la Comisión Judicial del Comité Internacional de Sistemática Bacteriológica (Judicial Commission on the International

Committee on Systematic Bacteriology), la eliminación de *L. casei* ATCC 393^T como especie tipo de *L. casei* y su inclusión en la especie *L. zaeae*. Estos autores también proponen la unificación de las especies de *L. casei* y *L. paracasei* en un único taxón con el nombre de *L. casei*, siendo *L. casei* ATCC 334 el neotipo. Nuestros resultados obtenidos mediante FISH concordaron en este sentido con los ya aportados por Mori *et al.*, 1997, Dellaglio *et al.*, 2002, Rodas *et al.*, 2003 y Diancourt *et al.*, 2007.

La sonda AABr dio hibridación positiva con todas las especies de la familia *Acetobacteraceae* ensayadas pero no con *Frateuria aurantia* ni con *L. plantarum* que no pertenecen a la misma familia o grupo filogenético.

Tabla 8. Resultado de las hibridaciones cruzadas mediante la técnica de FISH con las sondas desarrolladas. Las cepas son las mismas que las indicadas en la Tabla 2.

Especies	Reacción con la sonda															
	Eub338	Noneub	Lbrev	Lpara	Lcoll	Lcory	Lfarc	Lhlg	Lmali	Lplan	Lzeae	LU2	Ooeni	Pdamn	Pparv	Ppe
<i>Lactobacillus brevis</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i> ^a	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i> ^b	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus collinoides</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus farciminis</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus mali</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus zeae</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Leuconostoc citreum</i> (syn. <i>Leuc. amelibiosum</i>)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Leuconostoc citreum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Leuconostoc fallax</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Leuconostoc gelidum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Leuconostoc lactis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Oenococcus oeni</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Pediococcus acidilactici</i> ^f	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pediococcus damnosus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Pediococcus inopinatus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pediococcus parvulus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Weissella confusa</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Weissella hellenica</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Weissella paramesenteroides</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : Hibridación positiva. - : Hibridación negativa. ^aATCC 334, ^bCECT 475^T, ^c Todas las cepas de colección testadas dieron hibridación negativa con cada una de las sondas específicas.

Tabla 9. Resultado de las hibridaciones cruzadas mediante la técnica de FISH utilizando las sondas desarrolladas. Las cepas son las mismas que las indicadas en la Tabla 3.

Especies	Reacción con la sonda							
	Eub338	noneub	AABf	Aacet	Apast	Goxy	Ghans	Gliqu
Familia <i>Acetobacteraceae</i>	+	-	+					
<i>Acetobacter aceti</i>	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Acetobacter oeni</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Acetobacter pasteurianus/ pomorum</i>	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>Acidomonas methanolica</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Frateuria aurantia</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gluconacetobacter oboediens</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Gluconacetobacter europaeus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	+	-	+	-	-	-	+	-
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>Gluconacetobacter sacchari</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Gluconobacter asaii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Gluconobacter cerinus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Gluconobacter frateurii</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Gluconobacter intermedius</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Gluconobacter oxydans</i>	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-

+ : Hibridación positiva. - : Hibridación negativa.

Los resultados mostraron que las sondas hibridaban exclusivamente con su respectiva diana del 16S rADN (Tabla 8 y 9), resultando claramente diferenciadas las células unas de otras permitiendo así un fácil recuento. No hubo reacciones cruzadas, falsos negativos, precipitación de la sonda y tampoco uniones inespecíficas. Estos resultados se han conseguido en un plazo de 5-12 horas, con lo cual se demuestra que la hibridación *in situ* es un método rápido, preciso y sensible para la identificación directa, la detección y la enumeración de BA en vino, proveyendo así una fidedigna representación de las especies comúnmente encontradas en el vino.

Cuando se quiso realizar la detección simple de una única especie en vino, la hibridación se llevó a cabo con la sonda específica correspondiente, utilizándose la concentración de lisozima adecuada y la temperatura de hibridación óptima para la especie que se quería detectar (Tabla 7). En cambio, si el objetivo era la detección simultánea de diferentes especies se procedió a una hibridación múltiple con varias sondas. Tras probar diferentes condiciones de concentración de lisozima, tiempo, temperatura de incubación y lavados, se llegó a la

conclusión de que las condiciones más adecuadas de hibridación múltiple para BL eran incubación con 1 mg mL^{-1} de lisozima a temperatura ambiente durante 5 minutos y una temperatura de hibridación de 40°C durante 7 h. Para BA, se demostró que las condiciones más adecuadas para la hibridación múltiple eran la eliminación de lisozima y la hibridación a 40°C durante 5 h con las sondas. Los resultados mostraron que las identificaciones específicas múltiples eran posibles sin que se perdiese demasiada señal y además no se observaron reacciones cruzadas con el procedimiento consenso.

Una de las ventajas de la técnica de FISH es que se pueden usar 2 o más sondas simultáneamente en la misma preparación. Marcando esas sondas con diferentes fluorocromos podemos discriminar visualmente entre diferentes especies presentes en la misma preparación (ver Figura 15).

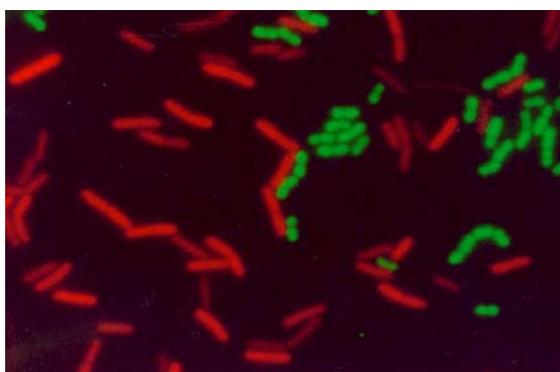


Figura 15. Imagen obtenida por FISH de un cultivo mixto de *L. plantarum* y *Leuc. mesenteroides* hibridados con la sonda LU2 marcada con fluoresceína y Lplan marcada con rodamina.

Del mismo modo, la misma célula puede hibridarse con 2 o más diferentes sondas que tienen diferentes dianas sobre los ribosomas. Si cada sonda se marca con un fluorocromo diferente, la misma célula puede mostrar ambos colores. Esto permite el trabajar con sondas diseñadas para detectar a diferentes niveles taxonómicos p. ej, género y especie. Un ejemplo se puede observar en la Figura 16.

La limitación del número de especies a detectar simultáneamente está en el número de fluorocromos diferentes que se encuentran en el mercado y en los filtros que posea el microscopio de fluorescencia.

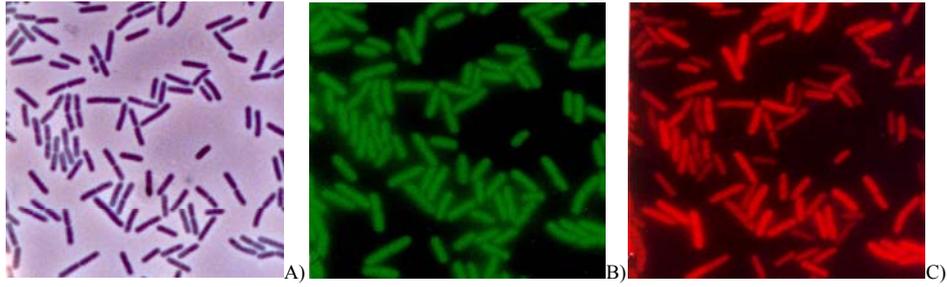


Figura 16. Imagen del mismo cultivo de *L. plantarum*. A) Contraste de fase, B) hibridada con la sonda universal EUB338 marcada con fluoresceína y C) hibridado con la sonda Lplan marcada con rodamina.

La hibridación *in situ* con sondas oligonucleotídicas marcadas fluorescentemente es una poderosa técnica para la detección de células únicas en complejos ecosistemas microbianos (Wagner y Amann, 1994; Manz *et al.*, 1996). La posibilidad de detectar diferentes especies, géneros o familias combinando sondas es una interesante aplicación de esta técnica (Amann *et al.*, 1996). Debido a que la molécula del 16S rARN contiene regiones altamente variables, es posible encontrar regiones de 20 a 30 bases que son completamente exclusivas de una sola especie. El análisis del 16S rARN es el que más se ha utilizado para diseñar sondas específicas de bacterias, ya que contiene aproximadamente 1550 pares de bases frente a los 75-120 del 5S rARN que proporcionaban pocas posibilidades de discriminación, o los 2300 del 23S que cuando se abordaron las estrategias de secuenciación resultaba mucho más costoso de secuenciar (Olsen y Woese, 1993).

Aunque se han realizado múltiples estudios de hibridación *in situ* en análisis de comunidades de medios como fangos, medios acuáticos y suelos o composiciones de bacterioplancton (Amann *et al.*, 1995; Beimfohr *et al.*, 1993; Glöckner *et al.*, 1996; Glockner *et al.*, 1999; Heidelberg *et al.*, 1993), se han publicado muy pocos trabajos sobre aplicaciones de esta técnica en el estudio de los ecosistemas microbianos propios de alimentos o de los procesos de obtención de alimentos fermentados. Entre los pioneros se encuentra el estudio sobre patógenos en queso (Oliveira *et al.*, 2004) y otro sobre asociación de microorganismos a insectos que colonizaban harinas (Franke *et al.*, 2000). Es una técnica con gran potencial en el campo alimentario, ya que su facilidad de uso y su rapidez podrían evitar miles de millones de pérdidas en las industrias.

En este trabajo hemos adaptado la técnica de FISH para el análisis de la microbiota bacteriana asociada al proceso de vinificación (Figura 17). Esta técnica permite la detección y el recuento directo de microorganismos concretos en las muestras, pero además facilita la identificación de los aislados obtenidos a partir de las mismas, ya que esta tarea es muy laboriosa y lenta mediante los métodos tradicionales. El uso combinado de sondas a diferentes niveles taxonómicos permite estimar la fracción de determinados microorganismos dentro de un conjunto.

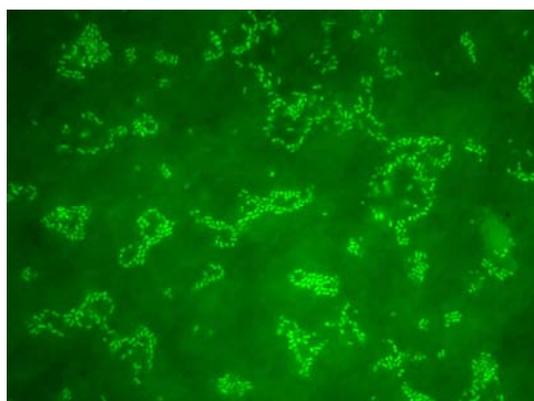


Figura 17. Hibridación de un vino acabado con la sonda Ooeni marcada con fluoresceína.

El protocolo de FISH sobre filtro es un método rápido y preciso que permite la detección de especies relacionadas con el deterioro del vino, la de especies que producen compuestos tóxicos, el control de calidad tras el embotellado y la de BL contaminantes en los preparados de cultivos de levadura o bacteria comerciales. Además de esto, el uso de FISH en la vinificación puede ser útil para predecir la realización o no de la FML, para identificar a las especies responsables de este proceso, controlar pies de cuba y para conocer los efectos de los tratamientos enológicos en las poblaciones de BL. Esta técnica permite detectar en pocas horas cualquier población emergente de BA que podría llegar a ser un gran problema si se desarrollara durante el proceso de vinificación. Así mismo podría ser útil en la industria del vinagre porque podría usarse para monitorizar las poblaciones de BA y detectar cualquier contaminación con especies indeseables. En el caso de que sólo se desee conocer la población total de BA durante el proceso de vinificación la sonda general AABf permite detectar a todos los miembros de la familia *Acetobacteraceae*. Este uso es muy apropiado para controlar el

riesgo de picado acético, porque para los bodegueros es mucho más importante conocer el número que las especies de BA que contaminan el vino. Las características de la técnica de FISH permiten al bodeguero poseer información con suficiente rapidez como para adoptar medidas preventivas, como la adición de SO₂, en el momento en que se percibe un mínimo incremento de la población bacteriana y prevenir el crecimiento de microorganismos antes de que ocurra la alteración.

4.1.4 Comparación de los resultados de FISH en porta y filtro y evaluación de la pérdida de células

De las 2 técnicas de hibridación comparadas en porta y en filtro, la segunda es mucho más útil que la primera en casos de una baja concentración de bacterias dado que basta ajustar el volumen de la muestra para obtener el número adecuado de bacterias para poder ser visualizadas y contadas mediante FISH (Mori *et al.*, 1997). Esta técnica permite estimar la concentración de BL y BA aún cuando esta sea muy baja, ya que aunque la observación microscópica tiene un límite de detección de 10⁴-10⁶ céls cm⁻²; siempre se puede disminuir este umbral mediante la filtración de mayores volúmenes de vino sobre el filtro. Además, la disposición de células es bastante más homogénea en el filtro, y se evita la formación de agregados al no ser necesaria la centrifugación para recolectar las células de las muestras, por ello los recuentos son más fiables en filtro que en porta. Sin embargo, la hibridación en filtro presenta una mayor fluorescencia de fondo que en porta, además, en ocasiones se debe utilizar el ajuste del micrométrico en el microscopio para visualizar las diferentes capas en las que pueden localizarse las células debido a la matriz del policarbonato. Un tratamiento digital de la imagen mejora considerablemente el proceso al tiempo que lo automatiza y hace más objetivo que la observación personal directa.

Los resultados del ensayo para estimar la pérdida de células durante la hibridación y lavados en porta y en filtro, mostraron que esta era más elevada en el caso de la hibridación en porta (20% del total de células) que en el caso de la hibridación en filtro (menos del 10%), ver Tabla 10. Ello es debido a la mejor adhesión de las células a la matriz de los filtros de policarbonato que a la gelatina que recubre los portas (Blasco *et al.*, 2003) y al procedimiento de lavado.

Tabla 10. Porcentaje de células detectado mediante hibridación *in situ* en filtro y porta.

	Muestra	Porcentaje de células detectadas con sondas marcadas				
		Eub338	LU2	Lplan	Lbrev	Aacet
Filtro	CECT 219	93.1 ± 0.5	92.7 ± 1.1	--	--	--
	CECT 748	94.9 ± 0.5	--	94.8 ± 3.2	--	--
	CECT 216	95.2 ± 0.3	--	--	95.9 ± 1.3	--
	CECT 298	93.5 ± 0.5	--	--	--	93.2 ± 0.5
Porta	CECT 219	81.0 ± 0.5	80.8 ± 1.3	--	--	--
	CECT 748	82.3 ± 1.1	--	82.0 ± 2.8	--	--
	CECT 216	91.8 ± 0.2	--	--	90.7 ± 0.6	--
	CECT 298	82.2 ± 0.5	--	--	--	82.0 ± 0.5

--: no aplicable

4.2 Análisis del 16S-ARDRA

En trabajos anteriores desarrollados en nuestro laboratorio se utilizó la técnica de 16S-ARDRA para la identificación de BL del vino (Rodas *et al.*, 2003), creándose una amplia base de datos de especies de referencia y aislados de origen vínico. Sin embargo, no teníamos información sobre las BA, por lo que procedimos a obtener los perfiles de cepas de referencia de especies descritas en vino y de los aislados naturales comparándolos mediante el programa BioNumerics (ver apartado 2.3).

Aunque se requiere del crecimiento de colonias sobre placa, la técnica del 16S-ARDRA reduce el tiempo necesario para la identificación por métodos fenotípicos convencionales, al no ser necesaria la extracción de ADN para amplificar el gen del 16S del rARN. El ADN del gen 16S se amplificó tomando una única colonia (como ya se especificó en el apartado 2.3 de Material y Métodos), con esta estrategia se obtuvo ADN de suficiente calidad para realizar la digestión de éste. No se observaron diferencias en la amplificación cuando se compararon los resultados obtenidos desde ADN purificado (mediante extracción de ADN en disco de agarosa) o desde colonia (datos no mostrados). Como se esperaba, se obtuvieron fragmentos de 1480 pb correspondiente al tamaño del gen ribosomal 16S de BA (Figura 18a), y las digestiones de éste generaron fragmentos del tamaño esperado.

Para decidir qué enzimas eran los más apropiados para distinguir diferentes especies de la familia *Acetobacteraceae*, se realizaron digestiones virtuales del gen ribosomal 16S mediante el uso de programas informáticos como DNAMAN y de NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>), u otros muchos programas como los situados en páginas: <http://watcut.uwaterloo.ca/watcut/watcut/template.php> o <http://www.restrictionmapper.org>. Tras estimar virtualmente los perfiles generados por un amplio rango de enzimas, la conclusión a la que se llegó fue que los enzimas más discriminantes para las especies de BA de nuestro interés eran: *AluI*, *BfaI* y *HaeIII*. La restricción real del fragmento amplificado del gen 16S rRNA con estas enzimas generó fragmento del tamaño esperado (Figuras 18b, 19 y Tabla 11).

Con *AluI* se obtuvieron 6 diferentes grupos de restricción a partir de 17 especies de referencia diferentes. Dos de estos siete grupos de restricción contenían una única especie (Tabla 11) pero otros 5 contenían varias; así en el perfil III encontramos las especies *A. aceti* y *A. oeni*. En el perfil IV encontramos las especies *A. pomorum* y *A. pasteurianus*. En el perfil

V se encontraban *G. oxydans*, *G. asaii*, *G. cerinus* y *G. frateurii*. El grupo VI incluía a *Ga. hansenii*, *Ga. europaeus*, *Ga. xylinus*, *Ga. oboediens* y *Ga. intermedius*. El grupo VII contenía 3 especies, *Ga. diazotrophicus*, *Ga. liquefaciens* y *Ga. sacchari*.

La digestión con *HaeIII* permitió separar *G. oxydans* de los otros tres que exhibían el patrón V con *AluI*. Además con *HaeIII* se logró diferenciar *Ga. hansenii* del resto que presentaban el perfil VI con *AluI*, y por último, con *HaeIII* se consiguió diferenciar *Ga. sacchari* de *Ga. diazotrophicus* y *Ga. liquefaciens* que compartían el perfil VII con *AluI*.

La digestión con *BfaI* no mejoró la discriminación del grupo *G. asaii*, *G. cerinus* y *G. frateurii*, ni del grupo *Ga. europaeus*, *Ga. oboediens* y *Ga. intermedius*. En cambio con *BfaI* se consiguió discriminar *Ga. diazotrophicus* de *Ga. liquefaciens* y *Ga. sacchari*. En este caso, el uso de las 3 enzimas permitió discriminar todas las especies del grupo VII.

Finalmente, en el caso de *A. aceti* y *A. oeni* fue posible la discriminación con *HphI*.

Los patrones obtenidos tanto virtuales como reales permitieron la discriminación de casi todas las especies de BA del vino, con la excepción de *Ga. xylinus* que compartía perfiles de restricción *AluI*, *BfaI* y *HaeIII* con *Ga. europaeus*, *Ga. oboediens*, y *Ga. intermedius* debido a la gran semejanza de secuencia del 16S. La información obtenida tras aplicar la técnica 16S-ARDRA a las especies de referencia se recoge en la Tabla 11 y en la Figura 18 y 19.

Tabla 11. Tamaño de los fragmentos experimentales obtenidos de la amplificación con los cebadores pA y pH, tras la digestión del gen ribosomal 16S con los siguientes enzimas.

		Enzima usado: AluI
Perfil I	<i>Acidomonas methanolica</i>	547,264 ^D ,209,209,143 ^I ,67,42
Perfil II	<i>Frateuria aurantia</i>	361,293,212,205,165,118 ^I ,76 ^D ,63,42
Perfil III	<i>Acetobacter aceti</i>	316,283,231,208,191,142,67,42
	<i>Acetobacter oeni</i>	
Perfil IV	<i>Acetobacter pomorum</i>	439, 316, 282, 210, 191, 42
	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	
Perfil V	<i>Gluconobacter oxydans</i>	547, 286 ^D , 204, 191, 143 ^I , 67, 42
	<i>Gluconobacter asaii</i>	
	<i>Gluconobacter cerinus</i>	
	<i>Gluconobacter frateurii</i>	
Perfil VI	<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	756, 472 ^D , 143 ^I , 67, 42
	<i>Gluconacetobacter europaeus</i>	
	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	
	<i>Gluconacetobacter oboediens</i>	
	<i>Gluconacetobacter intermedius</i>	
Perfil VII	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	756, 263 ^D , 209, 143 ^I , 67, 42
	<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	
	<i>Gluconacetobacter sacchari</i>	

		Enzima usado: HaeIII
Especies de perfil V no discriminadas con <i>AluI</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>	538, 276, 179, 158, 156 ^D , 70 ^I , 66, 34
	<i>Gluconobacter asaii</i>	538, 276, 226 ^I , 179, 156 ^D , 66, 34
	<i>Gluconobacter cerinus</i>	
	<i>Gluconobacter frateurii</i>	
Especies de perfil VI no discriminadas con <i>AluI</i>	<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	538, 281, 226 ^I , 179, 156 ^D , 66, 34
	<i>Gluconacetobacter europaeus</i>	538, 226 ^I , 206, 179, 156 ^D , 75, 66, 34
	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	
	<i>Gluconacetobacter oboediens</i>	
	<i>Gluconacetobacter intermedius</i>	
Especies de perfil VII no discriminadas con <i>AluI</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	538, 281, 226 ^I , 179, 156 ^D , 66, 34
	<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	538, 292 ^I , 281, 179, 156 ^D , 34, 1
	<i>Gluconacetobacter sacchari</i>	

		Enzima usado: <i>BfaI</i>
Especies de perfil VII obtenido con <i>AluI</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	695, 481 ^l , 198 ^D , 106
	<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	695, 272, 209 ^l , 198 ^D , 106
	<i>Gluconacetobacter sacchari</i>	

		Enzima usado: <i>HphI</i>
Especies de perfil III obtenido con <i>AluI</i>	<i>Acetobacter aceti</i>	541, 475, 125, 98 ^l , 81, 68, 50, 42 ^D
	<i>Acetobacter oeni</i>	543, 329, 146, 104, 100 ^l , 81, 68, 50, 42 ^D

^D: Extremo derecho. ^l: Extremo izquierdo

Cuando se compararon los perfiles teóricos y experimentales del 16S-ARDRA con los 3 enzimas *AluI*, *BfaI* y *HaeIII*, se encontraron en ocasiones algunas diferencias respecto a anteriores referencias de otros autores tanto en el número como el tamaño de bandas. Las explicaciones de estas diferencias son a) el uso de los cebadores pA-pH que son diferentes a los utilizados en la secuenciación de las cepas publicadas en la base de datos GenBank y b) errores puntuales en las secuencias publicadas que implican la desaparición o aparición de lugares de restricción de los enzimas como ya establecieron Rodas *et al.*, (2003) al emplear esta técnica para la identificación de BL.

Como ejemplo del resultado de amplificación del 16S rADN y digestión de éste se puede ver la Figura 18.

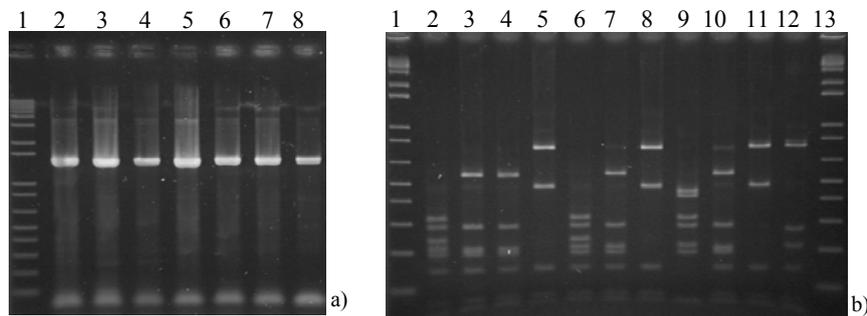


Figura 18. a) Resultado de la amplificación del 16S rARN de BA con la pareja de cebadores pA y pH. Carrera 1: Marcador (1kB Plus); carrera 2 y sucesivas: 16S de los aislados 6M, 1F, 16A, 2F, 8F, 4A, 9F. b) Resultado de la digestión con el enzima *AluI* del fragmento amplificado mediante PCR del gen ribosomal 16S. Carreras 1 y 13 Marcador (1kB Plus); carrera 2, 6M; carrera 3, 1F; carrera 4, 16A; carrera 5, 2F; carrera 6, 8F; carrera 7, 4A; carrera 8, 9F; carrera 9, 6A; carrera 10, 22A; carrera 11, *Ga. hansenii* (DSM 5602^T); carrera 12, *Ga. liquefaciens* (DSM 5603^T).

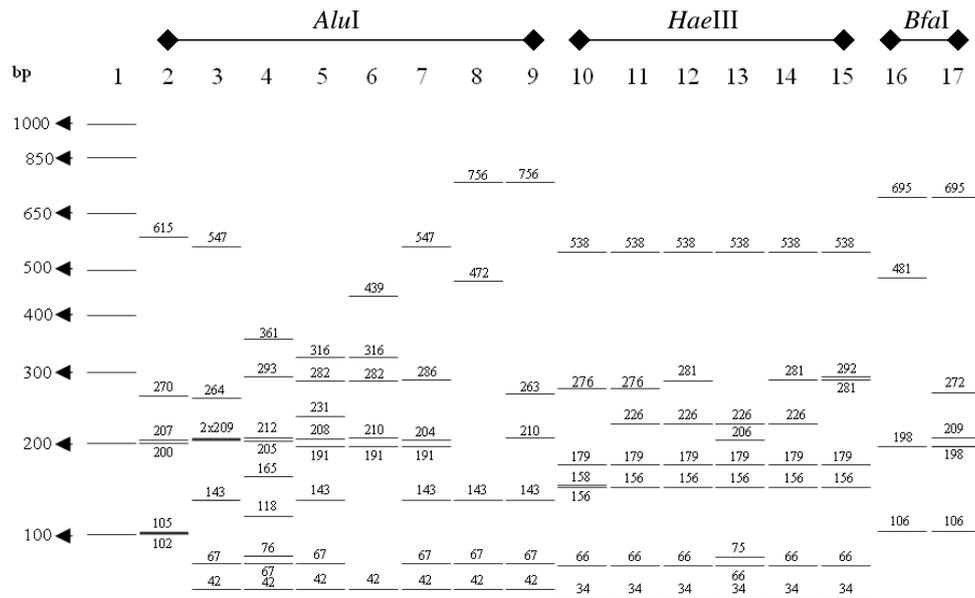


Figura 19. Perfiles de bandas reales obtenidos tras la digestión del 16S de cepas de referencia. Carrera 1 y 18, Marcador 1Kb Plus; 2, *L. plantarum* (BL del vino usada como “outgroup”); 3, Perfil I con *AluI*; 4, Perfil II con *AluI*; 5 con *AluI*, Perfil III con *AluI*; 6, Perfil IV con *AluI*; 7, Grupo V con *AluI*; 8, Grupo VI con *AluI*; 9, Grupo VII con *AluI*, 10, *G. oxydans* con *HaeIII*; 11, *G. asaii*, *G. cerinus* y *G. frateurii* con *HaeIII*; 12, *Ga. hansenii* con *HaeIII*; 13, *Ga. europaeus*, *Ga. xylinus*, *Ga. oboediens* y *Ga. intermedius* con *HaeIII*; 14, *Ga. diazotrophicus* y *Ga. liquefaciens* con *HaeIII*; 15, *Ga. sacchari* con *HaeIII*; 16, *Ga. diazotrophicus* con *BfaI*; 17, *Ga. liquefaciens* y *Ga. sacchari* con *BfaI*.

La técnica de restricción del 16S ha sido utilizada previamente para identificar BA aisladas de vinos y vinagres (Ruiz *et al.*, 2000; Gullo *et al.*, 2006; Trček y Raspor, 1999; Trček *et al.*, 2000), encontrando resultados de identificación semejantes a los encontrados en este trabajo. La diferencia de la metodología de este trabajo respecto a los previos es el uso de cebadores que permiten una amplificación del gen ribosomal de mayor tamaño y ello posibilita el encontrar mayor número de dianas de corte para los enzimas usados, lo que facilita la discriminación entre especies.

Con esta técnica fue posible la identificación de aislados de las especies de BA que normalmente se encuentran en vino: tres especies del género *Acetobacter* (*A. aceti*, *A. oeni* y *A. pasteurianus*), dos especies del género *Gluconacetobacter* (*Ga. hansenii*, y *Ga. liquefaciens*) y una especie del género *Gluconobacter* (*G. oxydans*). Sin embargo no fue

posible discriminar entre *A. pasteurianus* y *A. pomorum* debido a la elevada semejanza de las secuencias del gen 16S. De hecho, el gen del 16S rADN de estas 2 especies difiere únicamente en 3 bases no consecutivas (posiciones 576, 757 y 765. Ver figura 20).

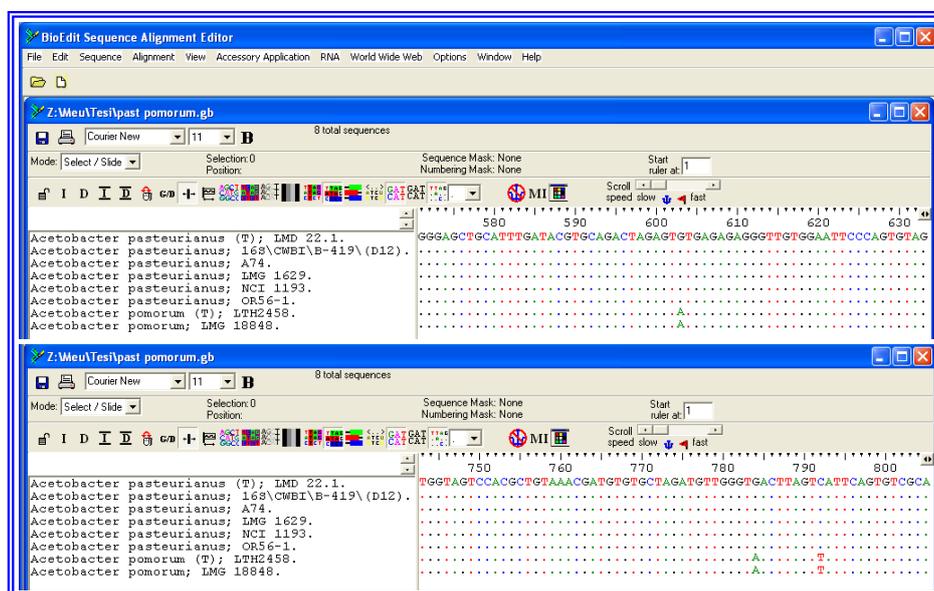


Figura 20. Alineamiento de las especies *A. pasteurianus* y *A. pomorum* mostrando los lugares donde difieren.

Algunos autores que han utilizado técnicas como la restricción de los espaciadores intergénicos 16S-23S tampoco encontraron diferencias en los perfiles de restricción de estas secuencias entre estas 2 especies (Ruiz et al., 2000), por ello han surgido algunas dudas sobre la validez de la separación de estas dos especies ya que su separación como especies individuales fue propuesta por Sokollek *et al.*, (1998) basándose en hibridaciones ADN-ADN, secuenciación del 16S rADN y caracterización fenotípica. Pero en 2002 Cleenwerck *et al.*, se opusieron a esta proposición ya que sus resultados diferían con los resultados obtenidos por Sokollek *et al.*, (1998) y además con los métodos de cálculo de la proximidad del ADN. En nuestro caso también fuimos incapaces de separarlas y junto con Cleewercker et al., (2002) y González *et al.*, (2006) sugerimos que la clasificación de estas dos especies como individuales debería ser revisada.

Del mismo modo que Ruiz *et al.*, (2000) y Poblet *et al.*, (2000a), nosotros no pudimos diferenciar *Ga. xylinus* de *Ga. europaeus* con ninguno de los enzimas analizados. Según González *et al.*, (2006), el gen ribosomal del 16S de *Ga. europaeus* y *Ga. xylinus* tiene 5 pares de bases diferentes (posiciones en *E. coli* 6, 288, 565, 581 y 1070). Pero cuando se compararon todas las secuencias disponibles en la red de estas cepas se puede comprobar que los sitios 288, 565 y 581 son bien mutaciones puntuales en la cepa *Ga. xylinus* LMG1515, o bien errores en la secuenciación. El único lugar con diferencia consensos entre las cepas de la misma especie es el 1070 (ver Figura 21). En este trabajo los cebadores utilizados permitieron incluir una diferencia más, la posición 6 pb a diferencia de lo publicado anteriormente por Ruiz *et al* (2000) y González *et al*, (2006). Sin embargo no se encontró ningún enzima capaz de diferenciar *Ga. europaeus* y *Ga. xylinus* ya que se generaba un fragmento de 6 pb incapaz de visualizarse en geles de agarosa normales (2-3% p/v). Para diferenciar estas especies se podría utilizar PCR-RFLP de las regiones ITS comprendidas entre 16S-23S rADN como hicieron Sievers *et al.*, (1996) los cuales obtuvieron distintos patrones usando el enzima *PvuII*. Estas dos especies comparten un 99.6% del ADN ribosomal 16S secuenciado y han sido separadas como especies diferentes en base a hibridaciones ADN-ADN y diferencias fenotípicas tales como el requerimiento de ácido acético por parte de *Ga. europaeus* (Sievers y Teuber, 1995).

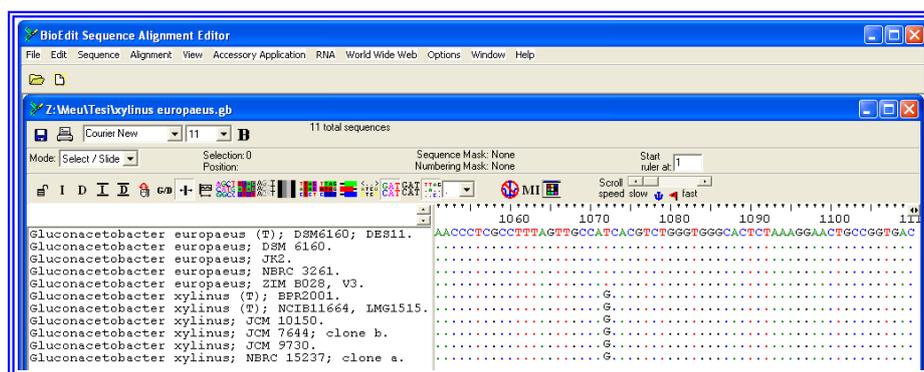


Figura 21. Alineamiento de las especies *Ga. europaeus* y *Ga. xylinus* mostrando los lugares donde difieren.

Una limitación de la técnica 16S-ARDRA sería por tanto la incapacidad para discriminar especies que comparten una elevada homología en la secuencia del 16S rADN pero que a pesar de ello han mostrado ser diferentes por hibridación ADN-ADN (Katsura *et al* 2001;

Sokollek *et al* 1998), tales como *A. pasteurianus* y *A. pomorum* (Sokollek *et al*, 1998), o *G. asaii*, *G. cerinus* y *G. frateurii* (Katsura *et al*, 2001). Esta limitación no reduce la aplicabilidad de la técnica a la identificación de BA en vinos porque el número de especies vínicas que no pueden ser identificadas es muy bajo, y en esos casos, otros métodos tales como RAPD o ITS-RFLP pueden usarse adicionalmente (Bartowsky *et al*, 2003; Trcek y Raspor, 1999).

Tras analizar los resultados obtenidos de las digestiones con cada uno de los enzimas se propone el uso secuencial de *AluI*, *HaeIII*, *BfaI* para la identificación de BA del vino mediante la técnica 16S-ARDRA y *HphI* para la diferenciación entre *A. aceti* y *A. oeni*. Después de demostrar la consistencia de la técnica 16S-ARDRA al compararla con los resultados obtenidos mediante FISH se usó para identificar un vasto número de bacterias aisladas del vino.

4.3 PCR específica para la detección de BA

Se desarrollaron cebadores específicos para la detección de miembros de la familia *Acetobacteraceae* y de las especies, *A. aceti*, *A. pasteurianus* / *A. pomorum*, *G. oxydans*, *Ga. hansenii* y *Ga. liquefaciens*. La secuencia de los mismos se basó en las secuencias de las sondas específicas desarrolladas para la técnica de FISH (Tabla 12). En todos los casos el cebador que se utilizó para amplificar la cadena complementaria fue AABf que tiene una secuencia complementaria reversa a AABr.

Tabla 12. Secuencias de los cebadores específicos. Todos se utilizaron en combinación con AABf excepto él mismo que se usó con I2B.

Cebador	Secuencia (5'→3')	Diana
I2B	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG	Eubacteria
AABf	CACCCGTGGATAGATCCCT	<i>Acetobacteraceae</i>
Aacet	TACAGCCTCTCCATAACAAG	<i>A. aceti</i>
Apast	CCAGCCCAACCTGATG	<i>A. pasteurianus/A. pomorum</i>
Goxy	GGTCCATCTCTGAACCGGT	<i>G. oxydans</i>
Ghans	GACACAGCCTCCGCATGT	<i>Ga. hansenii</i>
Gliqu	TACCCATCTCTGGATA	<i>Ga. liquefaciens</i>

El tamaño del fragmento amplificado para cada pareja de cebadores se detalla en la Tabla 13.

Como se puede comprobar en la Tabla 13 la reacción de PCR con la pareja de cebadores AABf e I2B mostró una alta especificidad para identificar a miembros de la familia *Acetobacteraceae*, ya que generó el fragmento de amplificación de 250 pb esperado con todas las especies probadas de esta familia pero no con otras especies de otras familias o grupos.

Se analizó la respuesta de los cebadores desarrollados frente a todas las especies descritas hasta el momento en mosto o vino. Aunque no se incluyeron todas las especies de los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Gluconacetobacter* en este estudio, sí se demostró que los cebadores fueron útiles para aquellas descritas en vino, siendo útiles en el análisis de 33 cepas de referencia correspondientes a 16 especies diferentes de BA de diferentes orígenes.

Los resultados obtenidos en la identificación de las cepas de referencia con los cebadores desarrollados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Tamaño de los fragmentos específicos de PCR (pb) obtenidos por amplificación con los cebadores descritos previamente.

Especies	Cepa	Parejas de cebadores y tamaño de los fragmentos generados (pb)					
		AABf I2B	AAB Aacet	AABf Apast	AABf Goxy	AABf Ghans	AABf Gliqu
<i>Acetobacter aceti</i>	CECT 298 ^T	250	882	-	-	-	-
<i>Acetobacter aceti</i>	LMG 1693	250	882	-	-	-	-
<i>Acetobacter aceti</i>	LMG 1372	250	882	-	-	-	-
<i>Acetobacter aceti</i>	LMG 1531	250	882	-	-	-	-
<i>Acetobacter oeni</i>	CECT 5830 ^T	250	-	-	-	-	-
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	CECT 474	250	882	-	-	-	-
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	CECT 824	250	-	-	895	-	-
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	DSM 3509 ^T	250	-	-	-	-	-
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	LMG 1553	250	-	885	-	-	-
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	LMG 1607	250	882	-	-	-	-
<i>Acetobacter pomorum</i>	LMG 18848 ^T	250	-	885	-	-	-
<i>Acetobacter</i> sp.	CECT 944	250	-	-	-	-	-
<i>Acidomonas methanolica</i>	LMG 1668 ^T	250	-	-	-	-	-
<i>Frateuria aurantia</i>	LMG 1558 ^T	-	-	-	-	-	-
<i>Gluconobacter asaii</i>	LMG 1390 ^T	250	-	-	-	-	-
<i>Gluconobacter cerinus</i>	LMG 1368 ^T	250	-	-	-	-	-
<i>Gluconobacter frateurii</i>	LMG 1365 ^T	250	-	-	-	-	-
<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>suboxydans</i>	CECT 360 ^T	250	-	-	895	-	-
<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>suboxydans</i>	CECT 4009	250	-	-	895	-	-
<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>oxydans</i>	LMG 1408 ^T	250	-	-	895	-	-
<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>sphaericus</i>	LMG 1414	250	-	-	895	-	-
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	LMG 7603 ^T	250	-	-	-	-	-
<i>Gluconacetobacter europaeus</i>	DSM 6160 ^T	250	-	-	-	-	-
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	DSM 5602	250	-	-	-	885	-
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	LMG 1524	250	-	-	-	885	-
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	LMG 1529	250	-	-	-	885	-
<i>Gluconacetobacter intermedius</i>	DSM 11804	250	-	-	-	885	-
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	DSM 5603	250	-	-	-	-	887
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	LMG 1348	250	-	-	-	-	887
<i>Gluconacetobacter oboediens</i>	DSM 11826 ^T	250	-	-	-	-	-
<i>Gluconacetobacter sacchari</i>	DSM 12717 ^T	250	-	-	-	-	-
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	CECT 315 ^T	250	-	-	895	-	-
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	LMG 1515 ^T	250	-	-	-	-	-
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	DSM 2004	250	-	-	-	-	-
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	CECT 473	250	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CECT 748 ^T	-	-	-	-	-	-

* Las especies cuya longitud de fragmento está coloreado resultaron estar identificadas inadecuadamente en las colecciones de cultivo originales. Ver explicación tras la tabla 14.

La PCR específica se usó para la identificación de colonias aisladas sobre medio sólido y para la detección de especies directamente del vino.

La detección de BA en vino supuso algunos problemas debidos fundamentalmente a la existencia de sustancias inhibidoras de la polimerasa (polifenoles) y a la baja concentración de bacterias en el sustrato. La inhibición de la reacción de amplificación por los polifenoles ya había sido puesta de manifiesto por otros autores que usaron polivinilpirrolidona (PVP) y polivinilpolipirrolidona (PVPP) para eliminar estos compuestos del vino (Guindreau *et al.*, 2001). Sin embargo nuestros resultados no mejoraron al utilizar estos productos tal y como se describe a continuación. Al realizar la serie de experimentos de amplificación descritos en el apartado **3.4.1** de Material y Métodos en la Figura 6, se obtuvieron resultados negativos al amplificar las muestras de vino picado y vino control filtrados a través de una columna de PVP, con o sin posterior centrifugación del filtrado. Ello se debe posiblemente a que el polímero PVP no solo retuvo los polifenoles sino a la mayoría de BA presentes en la muestra. La baja concentración de células en las muestras tratadas impidió su detección directa por PCR.

Por el contrario, sí se obtuvieron resultados positivos cuando las muestras de vino inoculado se centrifugaron y el sedimento resuspendido en agua estéril se utilizó como material molde para la amplificación (experimento C2 Figura 6). Los resultados de estas experiencias se muestran en la Figura 22.

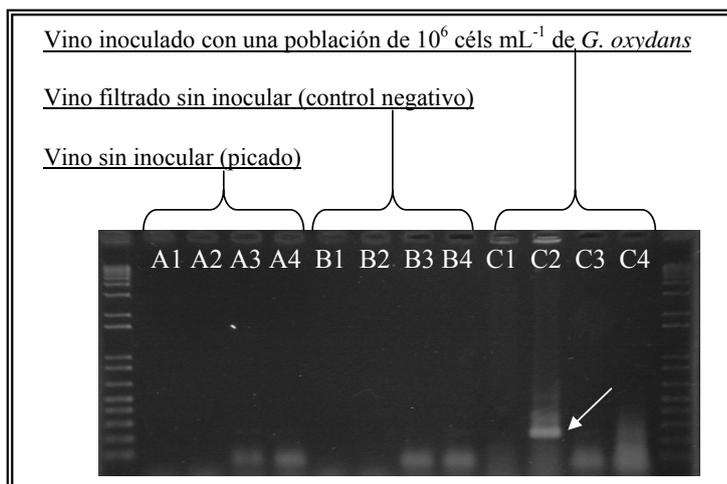


Figura 22. Amplificación con los cebadores I2B-AABf de muestras de vino tratadas de diferentes formas (ver Material y Métodos 2.4.1) desde. A1, directa; A2, centrifugada y lavada; A3, filtrada con la columna de PVPP; A4, filtrada con la columna de PVPP y centrifugada; B1, directa; B2; centrifugada y lavada; B3, filtrada con la columna de PVPP; B4; filtrada con la columna de PVPP y centrifugada; C1, directa; C2, centrifugada y lavada, C3, filtrada con la columna de PVPP, C4, filtrada con la columna de PVPP y centrifugada.

Tras la obtención de este resultado positivo con muestras de vino centrifugadas y lavadas se procedió a determinar el umbral de detección de la técnica. Para ello se realizaron diluciones seriadas de una población inicial de 10^6 céls mL^{-1} de *G. oxydans* y tras centrifugar y lavar las células presentes en cada una de las diluciones, se llevaron a cabo las reacciones de amplificación directa y anidada de cada una de ellas (ver Figura 23 a y b). En este último caso fue necesaria la realización de una PCR anidada cuando la población bacteriana no era demasiado elevada. El tiempo necesario para detectar las especies de BA en vino fue de 5 horas.

En 2005, González *et al.*, (b), describieron la técnica de PCR anidada para la enumeración y detección de BA. A diferencia de nosotros que no extrajimos el ADN total del vino, ellos sí lo hicieron utilizando el método descrito por Rademaker y De Bruijn (2005) y mediante choque de temperatura, después realizaron la PCR, llegando a la conclusión de que el límite de detección era de 10 céls mL^{-1} . En este trabajo se realizó la PCR directamente del vino,

consiguiéndose un límite de detección de 100 céls mL⁻¹. Dado que las concentraciones de *A. pasteurianus* y *A. aceti* suelen ser de 10¹-10³ céls mL⁻¹ sin que se ocasione ningún deterioro en el vino durante el almacenaje de vinos a granel en bodegas (Bartowsky *et al* 2003; Drysdale y Fleet, 1985a; Trcek y Raspor, 1999) la técnica de PCR descrita en este trabajo es adecuada para la detección de bajas concentraciones de BA durante la vinificación, y por tanto permite tomar medidas preventivas para evitar cualquier deterioro en el vino.

Como resumen: la pareja de cebadores AABf-I2B es una herramienta muy potente para detectar la presencia de cualquier especie de la familia *Acetobacteraceae* que pudiera causar deterioro en el vino. Si además de querer saber si el vino contiene BA interesara detectar la presencia concreta de una determinada especie, los cebadores específicos desarrollados en este trabajo también facilitarían enormemente esta tarea ya que se puede realizar una amplificación del gen 16S ribosomal con los cebadores pA y pH y después usar los cebadores específicos como se ha descrito previamente en material y métodos **2.4.1** (Figuras 7 y 8).

La reacción de amplificación directa fue positiva cuando la muestra procedió del vino inoculado con una población bacteriana de 2.10⁶ céls mL⁻¹, centrifugado y resuspendido, pero no cuando se realizó la amplificación de la muestras diluida 10, 100, 1000 y 10000 veces. Se realizó una PCR anidada a partir de la mezcla de amplificación de estas muestras en las mismas condiciones que la PCR inicial. En este caso se observó amplificación positiva en las muestras que provenían de las diluciones 10, 100 y 1000, pero no 10000.

El recuento total de la suspensión original realizada mediante cámara Thoma (2.10⁶ céls mL⁻¹) correspondió con un recuento de viables de 2,5.10⁵ ufc mL⁻¹, lo cual indica que el número de viables es aproximadamente 10 veces inferior al número de células utilizadas. Esto quiere decir que la técnica de la PCR anidada permite detectar 100±12 céls mL⁻¹ en vino centrifugado y lavado, de las cuales 13±2 de ellas serían viables y detectables.

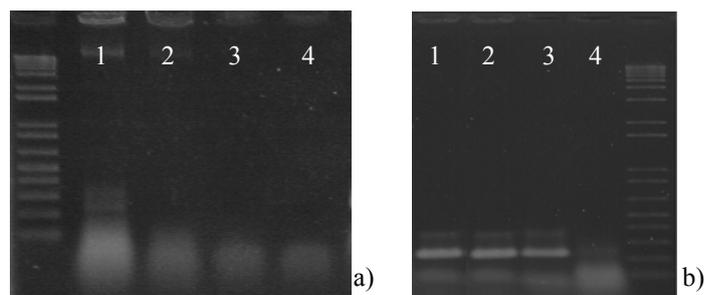


Figura 23. a) Resultados obtenidos mediante amplificación directa. Carrera 1 PCR directa de una población aproximada de 10^6 céls mL^{-1} , carrera 2 10^{-1} , carrera 3 10^{-2} , carrera 4 10^{-4} . y b) PCR anidada de del producto anterior de las siguientes diluciones. Carrera 1, 10^{-1} , carrera 2, 10^{-2} ; carrera 3, 10^{-3} ; carrera 4, 10^{-4} .

4.4 Comparación de los resultados obtenidos con FISH, 16S-ARDRA y PCR específica

La comparación de los resultados obtenidos con las tres técnicas (PCR específica, FISH y 16S-ARDRA) fueron coincidentes. Además también se observaron resultados coincidentes con las 3 técnicas cuando se aplicaron a aislados naturales de BA de mostos o vinos.

En cuanto a la PCR específica, una vez comprobada su fiabilidad, los cebadores especie-específico se usaron para identificar aislados de mosto y vino de Valencia, Utiel-Requena y La Rioja. Los fragmentos amplificados fueron totalmente específicos para las especies diana dando el tamaño esperado de fragmento para cada uno, y no dieron lugar a falsos positivos. Del mismo modo una vez comprobada la especificidad de las sondas estas se aplicaron a la identificación de BA aisladas de mosto o vino o directamente de estos medios.

La PCR específica y la técnica de FISH están basadas ambas en la secuencia específica de cebadores o sondas que anillarán o hibridarán únicamente con las especies diana a las que van dirigidas. Por tanto aunque son técnicas muy poderosas, específicas y sensibles, la limitación que tienen es que no pueden detectar bacterias para las que no hay cebador o sonda diseñada aún cuando esa bacteria se encuentre en el medio. Pero utilizando el cebador AABr o la sonda AABf cualquier bacteria perteneciente a la familia *Acetobacteraceae* puede ser detectada.

La técnica de 16S-ARDRA es muy útil a la hora de identificar los aislados en placa aunque es laboriosa y se requieren algunos días, ya que las colonias no crecen hasta pasadas 24-72 h, en ocasiones periodos más largos. Aunque como técnica rutinaria de identificación en laboratorio es muy útil ya que entre otras ventajas no requiere del diseño previo de sondas específicas.

Por tanto las técnicas de PCR específica y FISH parecerían ser las más adecuadas para su aplicación en la industria del vino, y su elección dependería más bien de las condiciones del laboratorio donde llevar a cabo los análisis.

Respecto a los resultados obtenidos con las especies de referencia las diferentes técnicas llegaron a la misma conclusión de identificación (Tabla 14) pero esta identificación en ocasiones estaba en desacuerdo con lo que la colección de cultivo anunciaba. Así la especie *A. aceti* LMG 1693 obtenida por nuestro grupo de esta colección en 2001 no dio fragmento de amplificación al realizar la reacción de PCR con los cebadores específicos para esta especie

(Tabla 13). Por el contrario se engloba en el grupo *Ga. xylinus*/ *Ga. europaeus*/ *Ga. intermedius*/ *Ga. oboediens* mediante la técnica de 16S ARDRA (Tabla 14). Esta incongruencia se resolvió cuando el nombre de esta cepa se cambió tiempo después en la colección de cultivo LMG por *Ga. xylinus*, concordando así con nuestros resultados. La especie *A. pasteurianus* CECT 474 dio banda de amplificación con la pareja de cebadores AABf-Aacet, no dio señal de amplificación con los cebadores de *A. pasteurianus* y se identificó como *A. aceti*. *A. pasteurianus* CECT 824 resultó ser *G. oxydans* con todas las metodologías usadas en este trabajo, del mismo modo que *A. pasteurianus* LMG 1607 resultó ser *A. aceti*. *Acetobacter* sp. no dio señal de amplificación con ninguna de las parejas de cebadores diseñada pero al utilizar la técnica de 16S-ARDRA se pudo englobar en el grupo *Ga. xylinus* / *Ga. europaeus* / *Ga. intermedius* / *Ga. oboediens*, comprobándose con posterioridad que la CECT ha considerado la cepa como *Ga. intermedius* de acuerdo a los resultados obtenidos con la secuenciación parcial del 16S rADN. La cepa *Ga. xylinus* CECT 315 fue identificada según nuestros estudios como *G. oxydans*, resultado que concuerda con el posterior cambio de nombre por parte de la CECT a *G. oxydans*.

Tabla 14. Resultados de la identificación de diferentes cepas de referencia usando tres metodologías diferentes: hibridación *in situ*, PCR específica y 16S-ARDRA.

Especies	Cepa	FISH	PCR específica	16S-ARDRA
<i>Acetobacter aceti</i>	CECT 298 ^T	A. aceti	A. aceti	A. aceti
<i>Acetobacter aceti</i>	LMG 1693	n.s	n.s	<i>Ga. xylinus</i> / <i>Ga. europaeus</i> / <i>Ga. intermedius</i> / <i>Ga. oboediens</i>
<i>Acetobacter aceti</i>	LMG 1372	A. aceti	A. aceti	A. aceti
<i>Acetobacter aceti</i>	LMG 1531	A. aceti	A. aceti	A. aceti
<i>Acetobacter oeni</i>	CECT 5830 ^T	n.s	n.s	A. oeni
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	CECT 474	A. aceti	A. aceti	A. aceti
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	CECT 824	G. oxydans	G. oxydans	G. oxydans
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	DSMZ 3509 ^T	A. pasteurianus/ A. pomorum	A. pasteurianus/ A. pomorum	A. pasteurianus/ A. pomorum
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	LMG 1553	A. pasteurianus/ A. pomorum	A. pasteurianus/ A. pomorum	A. pasteurianus/ A. pomorum
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	LMG 1607	A. aceti	A. aceti	A. aceti
<i>Acetobacter pomorum</i>	LMG 18848 ^T	A. pasteurianus/ A. pomorum	A. pasteurianus/ A. pomorum	A. pasteurianus/ A. pomorum
<i>Acetobacter sp.</i>	CECT 944	n.s	n.s	A. pasteurianus/ <i>Ga. europaeus</i> / <i>Ga. intermedius</i> / <i>Ga. oboediens</i>
<i>Acidomonas methanolica</i>	LMG 1668 ^T	n.s	n.s	<i>Ac. methanolica</i>
<i>Frateuria aurantia</i>	LMG 1558 ^T	n.s	n.s	<i>F. aurantia</i>
<i>Gluconobacter asaii</i>	LMG 1390 ^T	n.s	n.s	G. asaii/ <i>G. cerinus</i> / <i>G. frateurii</i>
<i>Gluconobacter cerinus</i>	LMG 1368 ^T	n.s	n.s	G. asaii/ <i>G. cerinus</i> / <i>G. frateurii</i>
<i>Gluconobacter frateurii</i>	LMG 1365 ^T	n.s	n.s	G. asaii/ <i>G. cerinus</i> / <i>G. frateurii</i>
<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>suboxydans</i>	CECT 360 ^T	G. oxydans	G. oxydans	G. oxydans
<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>suboxydans</i>	CECT 4009	G. oxydans	G. oxydans	G. oxydans
<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>oxydans</i>	LMG 1408 ^T	G. oxydans	G. oxydans	G. oxydans
<i>Gluconobacter oxydans</i> subsp. <i>sphaericus</i>	LMG 1414	G. oxydans	G. oxydans	G. oxydans
<i>Gluconobacter oxydans</i>	CECT 315 ^T	G. oxydans	G. oxydans	G. oxydans
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	LMG 7603 ^T	n.s	n.s	<i>Ga. diazotrophicus</i>
<i>Gluconacetobacter europaeus</i>	DSMZ 6160 ^T	n.s	n.s	<i>Ga. xylinus</i> / <i>Ga. europaeus</i> / <i>Ga. intermedius</i> / <i>Ga. oboediens</i>
<i>Gluconacetobacter hanseni</i>	DSMZ 5602 ^T	<i>Ga. hanseni</i>	<i>Ga. hanseni</i>	<i>Ga. hanseni</i>
<i>Gluconacetobacter hanseni</i>	LMG 1524	<i>Ga. hanseni</i>	<i>Ga. hanseni</i>	<i>Ga. hanseni</i>
<i>Gluconacetobacter hanseni</i>	LMG 1529	<i>Ga. hanseni</i>	<i>Ga. hanseni</i>	<i>Ga. hanseni</i>
<i>Gluconacetobacter intermedius</i>	DSMZ 11804	n.s	n.s	<i>Ga. xylinus</i> / <i>Ga. europaeus</i> / <i>Ga. intermedius</i> / <i>Ga. oboediens</i>
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	DSMZ 5603	<i>Ga. liquefaciens</i>	<i>Ga. liquefaciens</i>	<i>Ga. liquefaciens</i>
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	LMG 1348	<i>Ga. liquefaciens</i>	<i>Ga. liquefaciens</i>	<i>Ga. liquefaciens</i>
<i>Gluconacetobacter oboediens</i>	DSMZ 11826 ^T	n.s	n.s	<i>Ga. xylinus</i> / <i>Ga. europaeus</i> / <i>Ga. intermedius</i> / <i>Ga. oboediens</i>
<i>Gluconacetobacter sacchari</i>	DSMZ 12717 ^T	n.s	n.s	<i>Ga. sacchari</i>
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	LMG 1515 ^T	n.s	n.s	<i>Ga. xylinus</i> / <i>Ga. europaeus</i> / <i>Ga. intermedius</i> / <i>Ga. oboediens</i>
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	CECT 473	n.s	n.s	<i>Ga. xylinus</i> / <i>Ga. europaeus</i> / <i>Ga. intermedius</i> / <i>Ga. oboediens</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	CECT 748 ^T	<i>L. plantarum</i>	n.s	<i>L. plantarum</i>

n.s: no se ha desarrollado sonda/ cebador para esta especie

4.5 Aplicación de las técnicas de FISH, 16S-ARDRA y PCR específica.

4.5.1 Estudio de la evolución de la población de BA durante una vinificación industrial

En este estudio se aplicaron las técnicas desarrolladas en la primera parte de este trabajo para llevar a cabo el seguimiento de la población de BA durante la vinificación de mostos en dos depósitos industriales (A y B) realizada en la Cooperativa Vitivinícola de Ontinyent, situados en la D.O. Valencia. En ambos depósitos se realizó la FA que duró 6 días; después de la misma se unificaron los volúmenes en un nuevo depósito C, en el cual permaneció el vino hasta la realización de la FM (para más detalles de la vinificación ver apartado de Material y Métodos 2.7.1). Para llevar a cabo el seguimiento de BA se realizó un recuento y aislamiento de BA cultivables en dos medios MA y GYA, un recuento de BA mediante FISH, empleando la sonda AABr descrita en la Tabla 6, y las condiciones de permeabilización, hibridación y visualización descritas en los apartados de Material y Métodos 3.2.2, 3.2.3 y 3.2.5. Además se procedió a la identificación de los aislados crecidos sobre las placas usando las tres técnicas descritas previamente: FISH, 16S-ARDRA y PCR específica.

La evolución de la población total de BA estimada mediante recuento en placa mostró que la concentración de BA en la primera muestra tomada del depósito A (mosto recién obtenido) era de $2 \cdot 10^3$ ufc mL⁻¹, mientras que la del depósito B (que correspondía a un mosto que ya había iniciado la FA y que tenía una D_{20/20} de 1050) era de $8 \cdot 10^4$ ufc mL⁻¹ (Figuras 24 a 26). En ambos casos se apreció durante los 2 días siguientes una disminución de la concentración de BA de aproximadamente tres órdenes de magnitud; ello supuso la total desaparición de BA en el depósito A y la reducción hasta valores de 100 ufc mL⁻¹ en el B. A partir del día 6 los depósitos A y B se unificaron, por lo que la concentración de BA encontrada en la primera muestra del depósito C era aproximadamente la media de los valores encontrados en el último muestreo de los depósitos individuales. A partir de este momento los recuentos se realizan además mediante FISH y BacLight®. Los muestreos realizados en el depósito C entre los días 7 y 24 mostraron concentraciones de BA cultivables entre 10^1 y 10^2 ufc mL⁻¹. Se realizó un trasiego del depósito C el día 24, lo cual propició el crecimiento de BA, que alcanzaron valores de $5 \cdot 10^4$ ufc mL⁻¹ (ver Figuras 24 y 25). Este crecimiento

posiblemente se debiera a que el oxígeno aportado por el trasiego fue suficiente para que la población acética de naturaleza aeróbica se desarrollase, como ya demostraron que ocurría en sus estudios Millet y Lonvaud-Funel (2000). Ante el aumento del riesgo de picado acético se procedió a la adición de 2 g HL^{-1} de SO_2 para reducir la población bacteriana. Tres días después de la adición de sulfuroso, se comprobó mediante el kit de viabilidad BacLight® que la población de células vivas había descendido. Las últimas muestras tomadas 12 días después de la adición de sulfuroso demostraron la ausencia de BA, en las placas de recuento mientras que por la técnica del BacLight® se detecta una pequeña cantidad (10 céls mL^{-1}). Los recuentos en los dos medios de cultivo empleados resultaron muy semejantes entre sí.

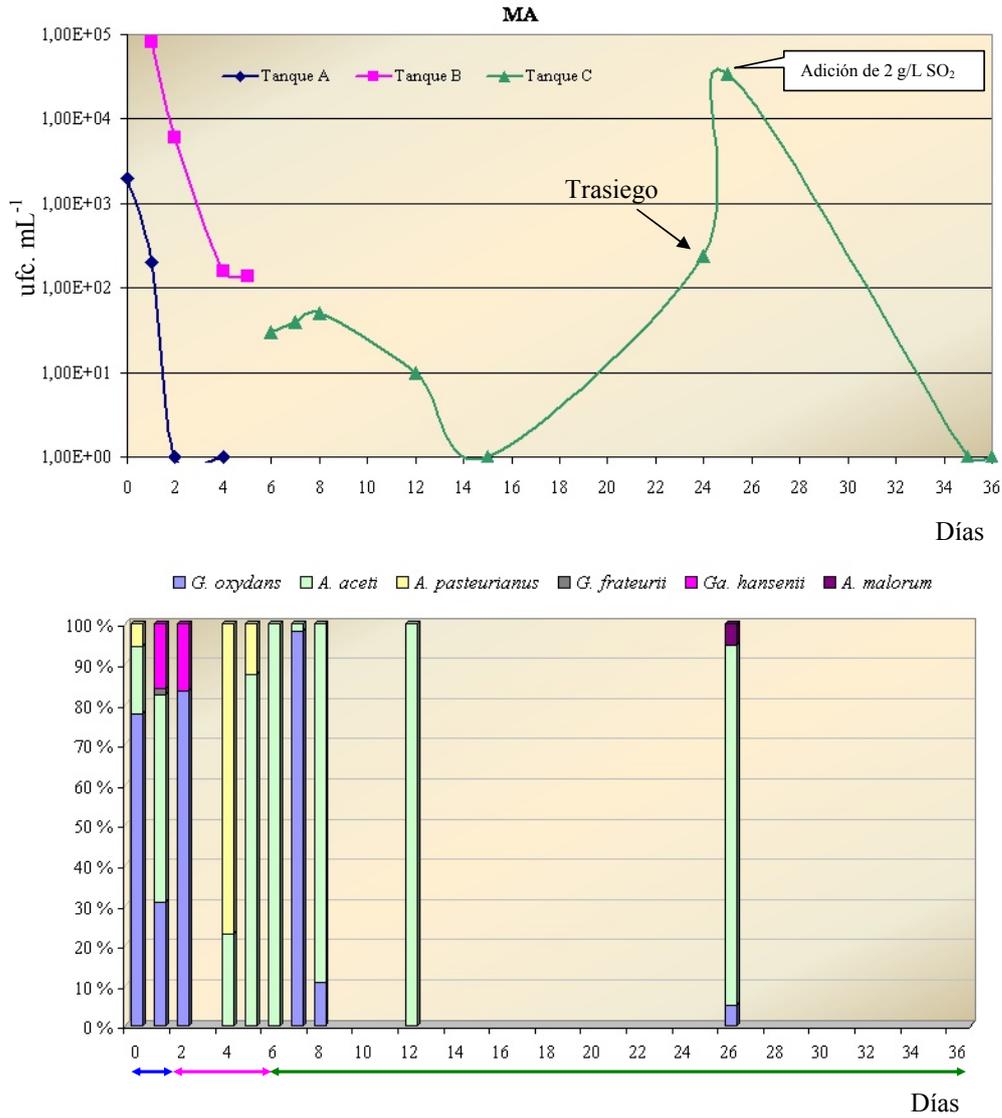


Figura 24. Frecuencia relativa de especies de BA identificadas en el vino y recuento de la población en medio MA.

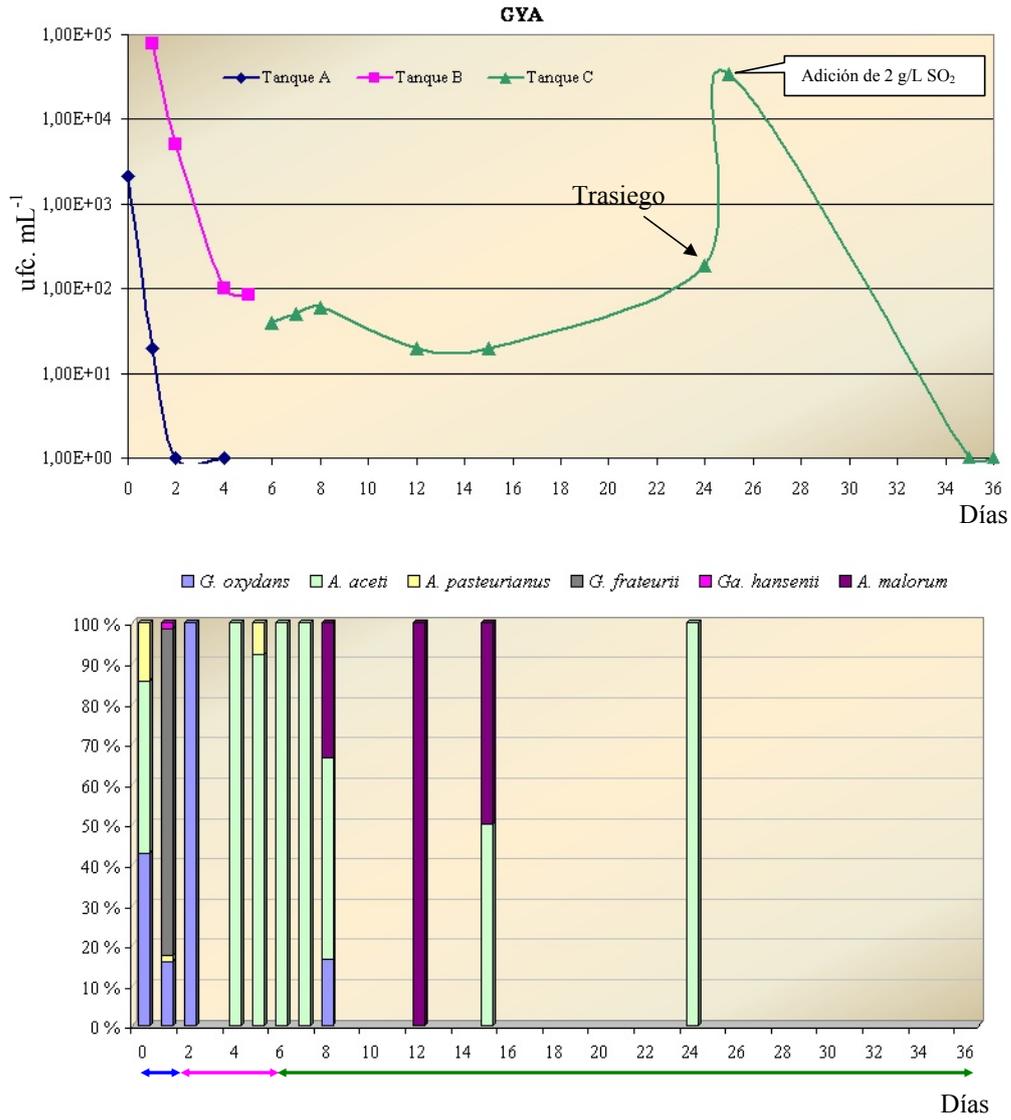


Figura 25. Frecuencia relativa de especies de BA identificadas en el vino y recuento de la población en medio GYA.

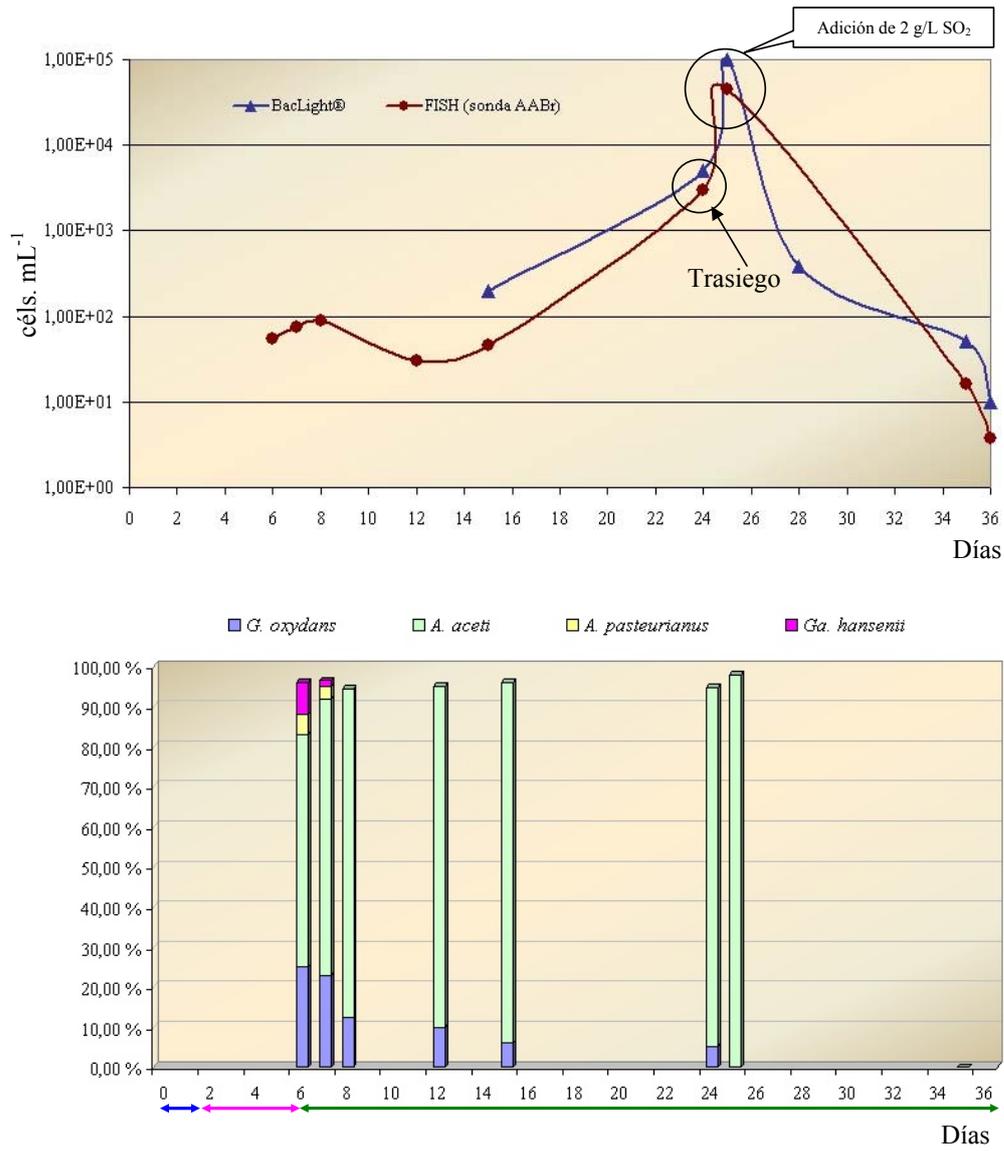


Figura 26. Recuento de células vivas estimadas mediante el kit de viabilidad BacLight[®], y recuento de BA mediante FISH en los estadios finales de vinificación

La comparación de los recuentos realizados por las técnicas de FISH y BacLight® demostró que el número de células vivas obtenido con el kit de viabilidad es ligeramente superior al número obtenido mediante FISH con la sonda AABr, esto es debido a que con el kit de viabilidad las células vivas se tiñen de verde si están vivas, independientemente del grupo bacteriano al que pertenezcan. A pesar de que se eliminaron del recuento con el kit BacLight® aquellas morfologías de tipo cocáceo, así como las morfologías bacilares dispuestas en cadenas largas, que no son propias de BA, no se puede asegurar que todas las células contadas representaran únicamente BA (Figura 27). Con la técnica de FISH y usando la sonda específica de la familia *Acetobacteraceae* (AABr) se pudieron contar todas las células pertenecientes a esta familia, obteniéndose valores superiores al recuento en placa. Ello se debe a que la técnica FISH permite la detección de células viables cultivables y no cultivables, mientras que por cultivo en placa sólo se detectan las primeras. Estas diferencias ya las observaron cuando emplearon la técnica DEFT y el recuento en placa para ver la evolución de las BA en un vino Millet y Lonvaud-Funel (2000).

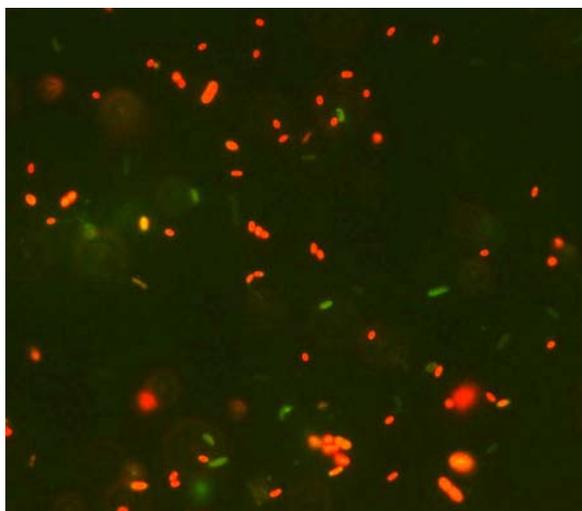


Figura 27. Fotografía de fluorescencia tras la tinción de una muestra de vino con el kit DEAD/LIVE BacLight®, se pueden apreciar las células muertas en rojo y las vivas en verde

La creencia general es que las BA disminuyen su número durante la FA, tal y como demostraron Joyeux *et al.*, (1984) al estudiar la evolución de las mismas durante la FA en vinos blancos de estilo Sauterne. Aunque parece imposible que las BA puedan sobrevivir y

crecer durante la FA debido a la ausencia de oxígeno, en este trabajo se ha evidenciado que durante la FA existen concentraciones entre 10^2 y 10^4 ufc mL⁻¹ de estas bacterias, que pueden sobrevivir a lo largo de toda la vinificación, e incluso multiplicarse bajo condiciones anaeróbicas o semianaeróbicas, tal como demostraron Joyeux *et al* (1984) al observar que el número de BA aumentaba de 20 céls a 3.10^4 céls mL⁻¹ tras el trasiego realizado al final de la FA, como también ocurrió en este estudio.

La identificación de las colonias aparecidas en GYA y MA mediante FISH, 16S-ARDRA y PCR específica llevaron a la conclusión de que las especies que aparecían durante la vinificación fueron *G. oxydans*, *Ga. hansenii*, *A. aceti* y *A. pasteurianus* (Tabla 15). Sin embargo, se encontraron otras colonias que no dieron señal de hibridación con ninguna de las sondas específicas de BA salvo con la de familia *Acetobacteraceae* (AABr), ni amplificación con ninguno de los cebadores a nivel de especie desarrollados en este trabajo. Se demostró mediante 16S-ARDRA que el perfil de restricción de un grupo de estos aislados semejante al que exhibían *G. asaii*/*G. cerinus*/*G. frateurii*, mientras que otro grupo mostraba un perfil que no estaba recogido en nuestra base de datos. Para resolver la incertidumbre se procedió a la secuenciación parcial de los genes ribosomales 16S de estos dos grupos de aislados, obteniéndose como resultado que los aislados del primer grupo pertenecían a la especie *G. frateurii*, mientras que los del segundo pertenecían a la especie *Acetobacter malorum*. Ninguna de estas dos especies había sido descrita previamente en vino.

Tabla 15. Resultados de las identificaciones realizadas mediante FISH, 16S ARDRA y PCR específica de los aislados de la vinificación en la Cooperativa Vitivinícola de Ontinyent.

Días	Cepa	FISH	PCR específica	16S-ARDRA	Secuenciación 16S
1	4A, 3A, 14A, 16A, 22A, 27A, 1B, 5B, 2C, 1D	<i>G. oxydans</i>	<i>G. oxydans</i>	<i>G. oxydans</i>	
	5A, 2B, 9B, 2D	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	
	6A, 3B, 7B, 8B, 3C	<i>A. pasteurianus</i>	<i>A. pasteurianus</i>	<i>A. pasteurianus</i> / <i>A. pomorum</i>	
	13A, 1C ^a	--	--	<i>G. asaii</i> / <i>G. cerinus</i> / <i>G. frateurii</i>	<i>G. frateurii</i>
2	3'A, 16A, 22A	<i>G. oxydans</i>	<i>G. oxydans</i>	<i>G. oxydans</i>	
	12D	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	
	20A ^a	--	--	<i>G. asaii</i> / <i>G. cerinus</i> / <i>G. frateurii</i>	<i>G. frateurii</i>
3	1F, 3F	<i>G. oxydans</i>	<i>G. oxydans</i>	<i>G. oxydans</i>	
	2F, 9F	<i>Ga hansenii</i>	<i>Ga hansenii</i>	<i>Ga hansenii</i>	
5	6M, 8F	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	
	5F, 7F	<i>A. pasteurianus</i>	<i>A. pasteurianus</i>	<i>A. pasteurianus</i> / <i>A. pomorum</i>	
6	1G, 5G', 5G, 7G1, 7G2, 7M, 9M	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	
	3G, 4G, 5G''	<i>A. pasteurianus</i>	<i>A. pasteurianus</i>	<i>A. pasteurianus</i> / <i>A. pomorum</i>	
7	2H, 1M	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	
8	6H, 1I, 2I	<i>G. oxydans</i>	<i>G. oxydans</i>	<i>G. oxydans</i>	
	5H	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	
12	3L, 5L	<i>G. oxydans</i>	<i>G. oxydans</i>	<i>G. oxydans</i>	
	8L, 9L	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	
15	12M ^b	--	--	No coincide con ningún perfil de las cepas de referencia usadas en este trabajo	<i>A. malorum</i>
20	1J	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	
	2J ^b	--	--	No coincide con ningún perfil de las cepas de referencia usadas en este trabajo	<i>A. malorum</i>
21	T22D	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	
32	10K, 30K	<i>G. oxydans</i>	<i>G. oxydans</i>	<i>G. oxydans</i>	
	1K, 5K, 6K, 9K, 12K, 13K, 14K, 15K, 16K, 18K, 19K, 20K, 21K, 22K, 23K, 24K, 25K, 26K, 29K, 32K, BZ1, BZ2, BZ3	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	<i>A. aceti</i>	
	11K	<i>A. pasteurianus</i>	<i>A. pasteurianus</i>	<i>A. pasteurianus</i> / <i>A. pomorum</i>	

^a y ^b especies identificadas tras secuenciación del 16S rADN, aunque ^b presentó un perfil de bandas distinto tras la digestión con *AluI* mediante uso de la técnica 16S-ARDRA

Cuando se intentaron comparar los porcentajes relativos de especies detectadas durante la vinificación directamente por FISH y las especies identificadas tras el aislamiento y recuento en placa, se observó que durante la FA fue imposible obtener datos fiables de FISH debido a la gran cantidad de levaduras y materia orgánica vegetal que impedía la correcta visualización de las diferentes especies de BA. Sin embargo, tras el primer trasiego ya se pudo monitorizar la evolución de las poblaciones por FISH, encontrándose una mayor población de BA por esta técnica que por recuento en placa. Ello puede deberse a que FISH fue capaz de detectar poblaciones de especies que eran viables pero no cultivables. Por FISH se detectaron las mismas o más especies que se identificaron tras el aislamiento en placa, con la excepción de *G. frateurii* y *A. malorum* para las que no se habían diseñado sondas específicas.

Se pudo comprobar que existía una evolución de especies a lo largo de la vinificación; así, en el tanque B las especies que aparecían en mosto eran *G. oxydans*, *A. aceti*, y en mucha menor proporción *A. pasteurianus*. Tras 24 horas las dos primeras especies aún se detectan y además aparecían *Ga. hansenii* y *G. frateurii*; sin embargo, a los dos días ya no se detectan BA vivas. En el tanque B, en la primera muestra obtenida (correspondiente a una densidad de 1050, es decir con FA comenzada) se encuentran las especies *G. oxydans* y *Ga. hansenii*, esta última en menor proporción. Al cabo de dos días estas especies desaparecen y son reemplazadas por *A. aceti* y *A. pasteurianus*, dominando la primera sobre la segunda hacia el final de la FA. Después de la FA los depósitos A y B se mezclan en el C y las especies que aparecen entonces en baja concentración (50 ufc mL^{-1}) son *A. aceti*, *A. malorum* y *G. oxydans* (Figuras 24 a 26). La primera aumenta su concentración hasta el día 24, la adición de SO_2 al día siguiente provocó la eliminación total de BA en el vino.

Cuando se comparan las gráficas de frecuencia relativa de especies en los medios GYA y MA encontramos algunas diferencias, por ejemplo *A. pasteurianus* y *G. hansenii* se aíslan mayoritariamente en MA, mientras que *A. malorum*, *G. frateurii* se aíslan preferencialmente en GYA. Estas diferencias se deberían principalmente a la diferente composición de estos medios que contienen manitol (MA) y glucosa (GYA) como fuentes de C y a la preferencia de las distintas especies por estas fuentes de C. Así, *A. pasteurianus* prefiere manitol para desarrollarse, por lo que se apreció un mejor crecimiento en MA, mientras que *A. malorum* parecía utilizar mejor la glucosa, por lo que crecía preferentemente en GYA, que es el medio recomendado por la DSMZ para el crecimiento de esta especie. Por ello, al comparar las

dinámicas de poblaciones de BA realizadas por diversos autores hay que tener en cuenta que el medio de cultivo empleado introduce un sesgo en la recuperación de las especies presentes en las muestras.

Los resultados sobre la evolución de BA durante la vinificación obtenidos en este trabajo coinciden esencialmente con los publicados por otros autores los cuales describen la presencia de *G. oxydans* y *Ga. hansenii* durante los primeros estadios de la FA y la de *A. aceti* a lo largo de toda la vinificación (González *et al.*, 2005; Poblet *et al.*, 2000b). *G. oxydans* es la especie de BA principalmente observada en bayas sanas, normalmente en una concentración de 10^2 - 10^5 céls mL⁻¹ (Du Toit y Lambrechts, 2002; Joyeux *et al.*, 1984). Esto no es sorprendente puesto que esta especie prefiere ambientes ricos en azúcares. En investigaciones realizada en vinos tintos sudafricanos, *G. oxydans* resultó ser la especie dominante en mostos de seis fermentaciones de vino comercial, junto con *A. pasteurianus* y *Ga. liquefaciens* en cantidades mucho menores (Du Toit y Lambrechts, 2002). Aunque se creía que *G. oxydans* muere rápidamente durante la FA debido a su baja tolerancia al etanol, Drysdale y Fleet (1985b) encontraron más de 10^4 céls mL⁻¹ en vino, aunque las concentraciones más normales al final de la FA suelen hallarse entre cero y 10^2 céls mL⁻¹ (Du Toit y Lambrechts, 2002; Joyeux *et al.*, 1984), coincidiendo estas cifras con las encontradas por nosotros. Aunque Du Toit y Lambrechts (2002) describen que *G. oxydans* desaparece por completo hacia mitad de la FA no encontrándose al final de FA, nosotros si la hemos detectado coexistiendo en esta fase con *A. aceti*. En este estudio hemos encontrado que *A. pasteurianus* y *A. aceti* también están presentes en mosto y durante la FA, a pesar de que su preferencia por el etanol como fuente de C frente a los azúcares (De Ley *et al.*, 1984) explicaría mejor su presencia durante los estadios tardíos de la FA y en el vino (De Vero *et al.*, 2006). Esto si se cumple en el caso de *A. aceti*, que sí se presenta en vinos acabados pero no *A. pasteurianus* como se ha dicho antes, también se ha encontrado en mosto y en fases tempranas de la FA. No es la primera vez que se detecta esta especie en los primeros momentos de la vinificación. Otros autores han detectado la presencia de *A. aceti* en la pulpa de las uvas, e incluso la han descrito como especie dominante en mosto y al principio de la fermentación (Vaughn, 1955; Okafor, 1975) junto con *G. oxydans*, *Ga. hansenii* y *A. pasteurianus* (Poblet *et al.*, 2000b; Silva *et al.*, 2000). Nosotros también la hemos detectado en este trabajo aunque en menor proporción que otras especies como *G. oxydans* y *A. pasteurianus*. Drysdale y Fleet (1989) encontraron que estas dos últimas especies podían crecer en conjunción con *S. cerevisiae* durante la FA, sin que la

presencia de la levadura supusiese un obstáculo para su desarrollo. Du Toit y Lambrechts (2002), Joyeux *et al.* (1984) y Poblet *et al.* (2000b) encontraron que *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *Ga. liquefaciens* y, en menor extensión *Ga. hansenii*, empiezan a dominar durante los estadios medios y finales de la FA, mientras que Drysdale y Fleet, (1985b) encontraron *G. oxydans* sólo al principio de la FA. Estos resultados difieren algo de lo que observamos nosotros en este trabajo.

Las diferencias entre los diversos autores consultados sobre la localización temporal de las distintas especies a lo largo de la vinificación pueden explicarse en parte por los diferentes medios de aislamiento que han utilizado y que, según se ha demostrado en este trabajo, propician el crecimiento de un determinado tipo de especies frente a otros (Figuras 24 y 25). Posiblemente, el empleo de los medios de cultivo MA y GYA ha propiciado la detección de especies que antes no habían sido descritas en vino, como *G. frateurii* o *A. malorum*, si bien también cabe pensar que la utilización de técnicas moleculares potentes como 16S-ARDRA o la secuenciación, han permitido la identificación de estas especies que podrían ser parte de las poblaciones normales de BA en el vino pero cuya identidad no habría podido dilucidarse con el empleo de metodologías más clásicas y de menor capacidad discriminante a nivel de especie.

Lo que sí queda claro es que la presencia de BA durante la FA no es tan rara como parecía; éstas pueden sobrevivir durante la FA, por lo que es de vital importancia para los bodegueros mantener el número de estas bacterias lo más bajo posible. Las técnicas de recuento que hemos desarrollado en este trabajo permiten conocer el nivel de BA en un vino. Si se detectan niveles bajos de este tipo de bacterias bastaría con hacer uso de sistemas preventivos, tales como el mantenimiento del vino en ausencia de oxígeno evitando las cámaras de aire, o cubriéndolos con un gas inerte. Si por el contrario, los niveles de BA son “preocupantes” ($>10^4$ céls mL⁻¹), debería de recurrirse a métodos paliativos como el uso de SO₂ (Amerine y Kunkee, 1968). De hecho, el seguimiento de la población de BA en esta Cooperativa tuvo una aplicación práctica directa, al permitirle al bodeguero conocer el crecimiento de la población acética a niveles “peligrosos” mucho antes de que se detectasen defectos sensoriales en el vino o un incremento en la acidez volátil. La adición de SO₂ para detener el desarrollo de las BA le permitió evitar la acetificación y mantener unos valores de acidez volátil inferiores a 0.5 g L⁻¹. Según Delfini y Formica, (2001) valores de acidez volátil superiores a 0.6 g L⁻¹ ya serían detectables en gusto y olfato.

4.5.2 Estudio de la dinámica de poblaciones de BL y BA en vinificaciones piloto.

Durante la vendimia de 2002 se realizaron varios ensayos de vinificación para establecer la influencia de distintas condiciones enológicas sobre la evolución de las poblaciones naturales o inoculadas de BL y BA, y sobre el tiempo de inicio y la duración total de la FML.

La evolución de la densidad y de la temperatura durante la FA del experimento descrito en el apartado 3.7.2 y en la Figura 10, se muestra en la Figura 28. En ella se observa el descenso de la densidad debido a la degradación de azúcares y formación de etanol durante la FA. Como se puede apreciar, la evolución de la densidad es muy semejante en ambos tanques T y P, salvo en las medidas realizadas el día siguiente de la retirada de los hollejos, en las que se observa una mayor densidad en el tanque P (día 5). Ello puede ser debido a que, como consecuencia de la retirada de los hollejos, también se eliminara parte de la microbiota fermentadora asociada a los mismos y ello enlenteciera la degradación de los azúcares. Sin embargo, la velocidad de fermentación se recuperó rápidamente en los siguientes días, siendo muy similar en ambos tipos de tratamiento. Se puede observar en la gráfica de la Figura 28 que la maceración total o parcial no afectó a la marcha de la FA, con la salvedad ya comentada, que acaba casi al mismo tiempo en los dos tipos de experimentos. También se produce un ligero descenso en la temperatura de aproximadamente 3°C en los tanques de maceración parcial el día posterior a la eliminación de los hollejos (día 5), debido a que la retirada de los mismos supone una pérdida de calor. Sin embargo, posteriormente la evolución de la temperatura es similar en ambos tanques, al igual que ocurre con la densidad.

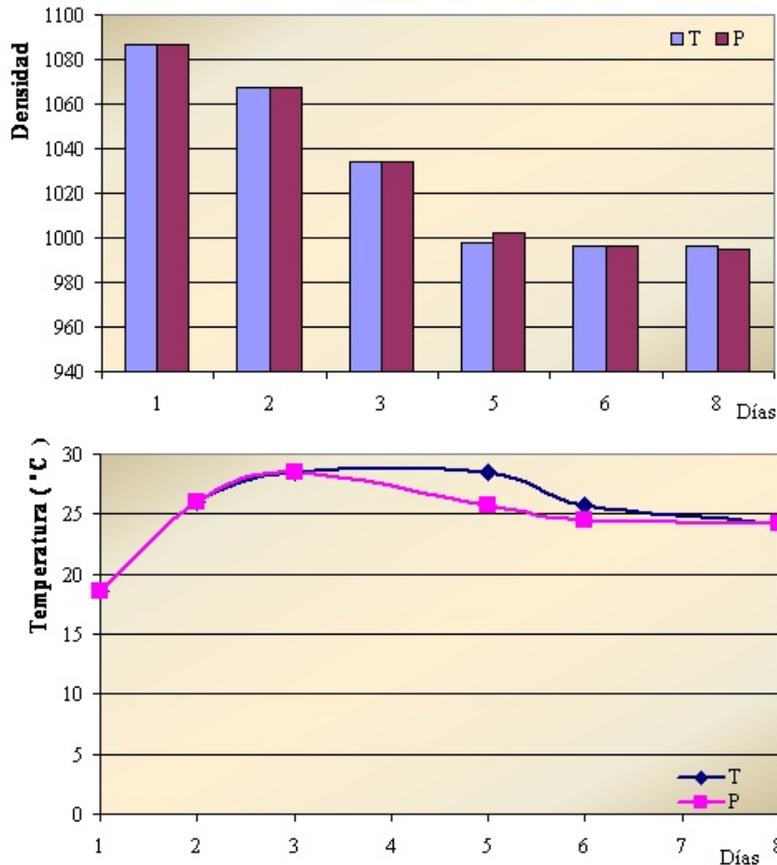


Figura 28. Representación de la evolución de la densidad y la temperatura durante la FA de los tanques T (maceración total) y P (maceración parcial).

• Recuento de BA

Los recuentos en placa (medio MA) de las poblaciones mostraron que la población acética era bastante elevada en mosto ($5 \cdot 10^6$ ufc mL⁻¹ ver Figura 29), pero durante la FA ésta descendió hasta cero, tanto en el caso de maceración parcial con los hollejos como de maceración total. Una vez finalizada la FA no se volvieron a detectar BA en ninguna de las condiciones ensayadas. Los resultados fueron semejantes en los dos tanques analizados (7 y 8). Los valores de los recuentos en placa se compararon con los recuentos de hibridación *in situ* mediante el uso de la sonda general para *Acetobacteraceae* (AABr). Mediante FISH se

obtuvieron valores de 7.10^7 céls mL^{-1} en mosto, valor superior al recuento en placa debido a que aquellas bacterias no viables pero aún vivas son capaces de dar señal de hibridación (Amann *et al*, 1995), como ya se comentó anteriormente. A mitad de FA los valores fueron de 5.10^5 céls mL^{-1} y cercanos a 0 (<10 céls mL^{-1}) al final de la misma, no volviéndose a detectar BA durante el resto de la vinificación en ninguna de las condiciones ensayadas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por recuento en placa.

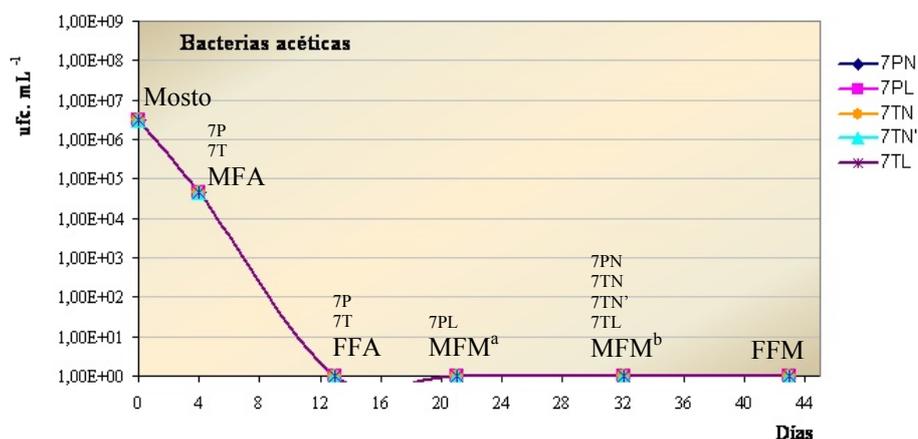


Figura 29. Resultados de los recuentos de BA obtenido mediante recuento en placa durante el proceso de vinificación en planta piloto del INCAVI en Reus. Se encuentra representado únicamente el tanque 7, debido a que los resultados fueron los mismos en el tanque 8. MFA: Mitad de fermentación alcohólica, FFA: Final de fermentación alcohólica, MMF^a: Mitad de fermentación maloláctica en el vino inoculado, MMF^b: Mitad de fermentación maloláctica en el resto de vinos, FFM^a: Final de la fermentación maloláctica en el vino inoculado, FFM^b: Final de la fermentación maloláctica en el resto de vinos

Los resultados resultaron ser los mismos para las dos réplicas (tanques 7 y 8).

La identificación mediante 16S-ARDRA de colonias obtenidas en placa a partir de las muestras obtenidas durante la fermentación, mostró que la especie mayoritaria en mosto era *G. oxydans*, como ya habían descrito previamente Joyeux *et al*, (1984), mientras que durante la FA *A. aceti* aumenta su proporción a expensas de *G. oxydans*, coexistiendo ambas en proporciones parecidas hasta su desaparición al final de la FA. Estos resultados coincidieron con los obtenidos mediante FISH a partir de muestras de mosto o vino analizadas directamente con sondas específicas (Figura 30).

La presencia de *G. oxydans* en etapas avanzadas de la FA e incluso en vinos ya acabados ya se había descrito en el experimento del apartado anterior, e igualmente ha sido puesta de manifiesto por otros autores (Joyeux *et al.*, 1984, González *et al.*, 2006).

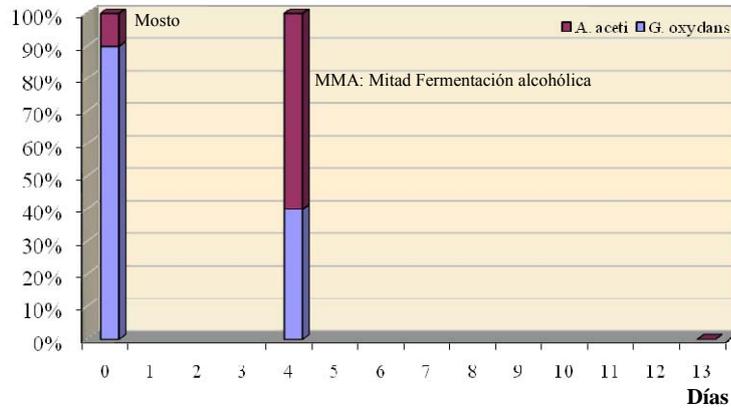


Figura 30. Composición relativa de las especies de BA durante la vinificación de los tanques 7, 8, y sus derivados durante su vinificación. Datos obtenidos mediante la técnica FISH y el empleo de sondas de BA específicas.

• Recuento de BL

Del mismo modo que para las BA, se realizó el seguimiento de poblaciones de BL en placas de medios de cultivo MRSm y MLO (ver Figura 31).

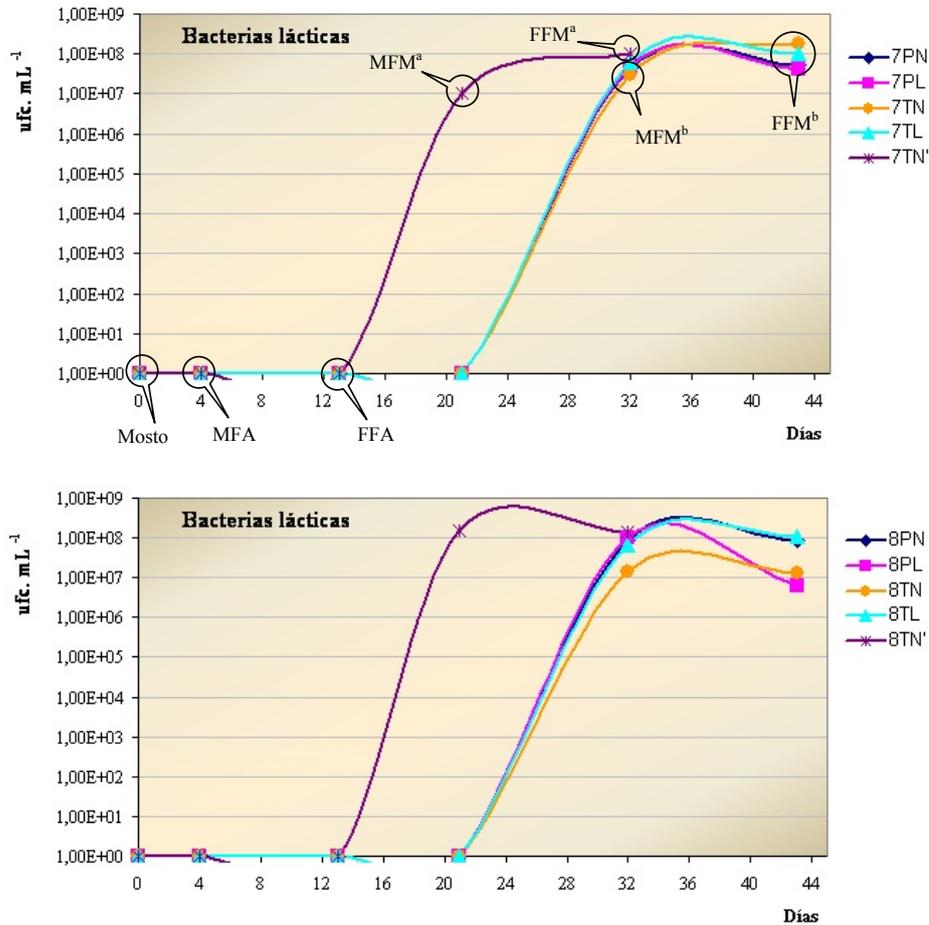


Figura 31. Representación de la evolución de BL cultivables durante el proceso de vinificación de los tanques 7, 8 y sus derivados realizado en el INCAVI en Reus. Datos obtenidos a partir del medio MLO. El significado de las abreviaturas se explica en el pie de la Figura 29.

El desarrollo de la población láctica es semejante en los depósitos 7PN, 7PL, 7TN, 7TL y en sus réplicas (8PN, 8PL, 8TL), aunque en 8TN el crecimiento de la población es algo más lento y no alcanza poblaciones tan elevadas como en los otros casos. En aquellos depósitos en

los que se adicionaron cultivos comerciales 7TN', y 8TN', el crecimiento en la población láctica se adelantó una semana, lo que tuvo como efecto el adelanto en 13 días el final de la FML, como se puede apreciar en la Figura 32. Aquí también se puede apreciar que entre los depósitos no inoculados, en los que más adelantada está la FML son 8PN, 8PL, 7TL ($< 0.5 \text{ g L}^{-1}$ de ác. málico residual a los 35 días), en segundo lugar 7PL y 7TN ($\leq 1 \text{ g L}^{-1}$), en tercer lugar 7PN (1.5 g L^{-1}), en cuarto lugar 8TN (2.2 g L^{-1}) y en quinto lugar 8TL (2.6 g L^{-1}).

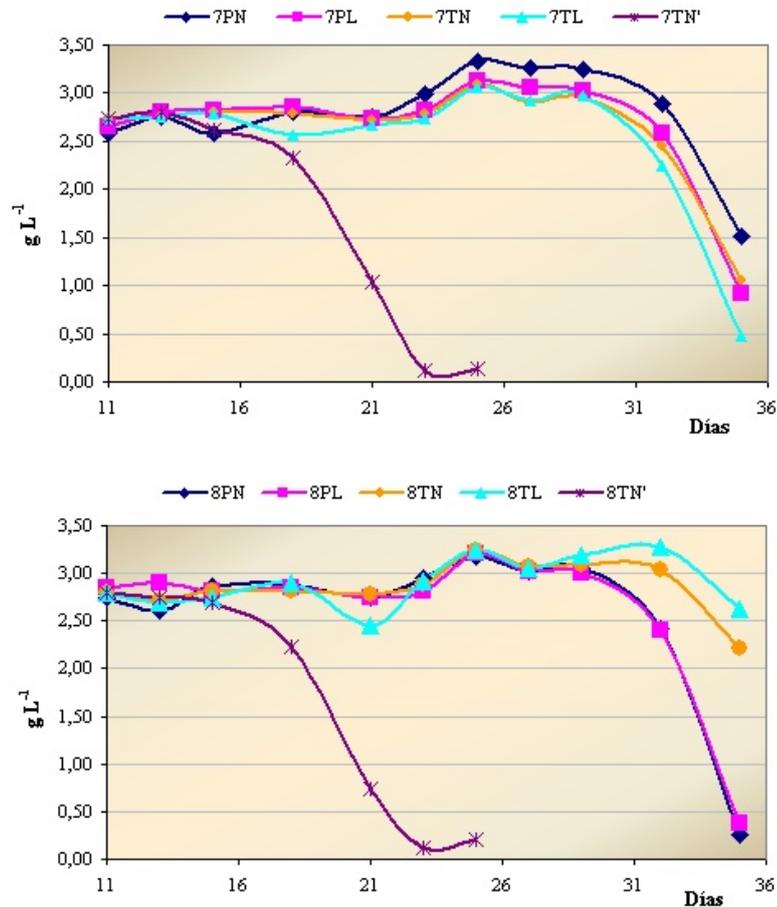


Figura 32. Representación de la evolución del ácido málico durante el proceso de vinificación de los tanques 7, 8 y sus derivados realizado en el INCAVI en Reus.

La identificación de las colonias aparecidas en placa mediante el uso de sondas específicas indicó que todas ellas pertenecían a la especie *O. oeni*.

El seguimiento de BL mediante FISH directamente en los vinos, utilizando sondas de detección de las especies normalmente descritas en vino, mostró que la especie responsable de llevar a cabo la FML fue *O. oeni* (ver Figura 33), tanto en las vinificaciones inoculadas con la cepa comercial *Lactobacter* (*O. oeni*) como en las vinificaciones con FML espontánea. No se detectó ninguna otra especie durante todo el periodo analizado. Estos resultados concuerdan con los obtenidos a partir la identificación de los aislados en placa, confirmando de esta manera la validez de la técnica de FISH para el seguimiento de las poblaciones de BL.

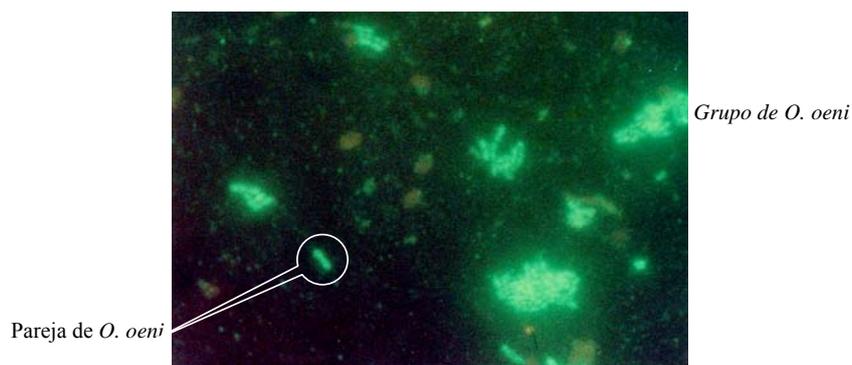


Figura 33. Hibridación de una muestra de vino al final de la FML con la sonda *Ooeni* marcada con fluoresceína.

En el medio MRSm no se obtuvo ningún tipo de crecimiento. La razón de ello es que *O. oeni* crece muy mal en este medio debido a que tiene un pH de 6.5 y a que contiene glucosa como fuente de C, mientras que el medio MLO tiene un pH de 4.8, fructosa y glucosa, y además zumo de tomate, que es una fuente de ácido pantoténico (vitamina B5). El pH demasiado alto y la ausencia de fructosa en el MRSm y de la vitamina explican la ausencia de crecimiento de esta especie en este medio, que es más adecuado para la recuperación de especies de *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. La ausencia de colonias pertenecientes a estos grupos en MRSm significó que éstas no existían en las muestras, como también se evidenció por FISH. La razón de que *O. oeni* crezca mejor en medios con fructosa, como el MLO, es porque esta especie transforma este azúcar en manitol y con esta reacción reoxidan el NAD(P)H₂ que producen durante su metabolismo, aumentando de esta manera el nivel intracelular de cofactores oxidados, lo que se traduce en un mejor crecimiento (Maicas *et al.*, 2002). Por otra parte, *O. oeni* requiere de varios factores de crecimiento, entre los que

se encuentra ácido pantoténico (Garvie, 1967), presente en el zumo de tomate que contiene el MLO. Además, *O. oeni* es un microorganismo acidófilo cuyo pH óptimo es 4.8, por lo que el pH del MRSm le dificulta el crecimiento.

Como se puede apreciar no parece existir relación entre el tiempo que tarda en iniciarse y completarse la FML y el tiempo de maceración con hollejos. Tampoco la presencia o ausencia de las lías durante la FML parece tener influencia. Sin embargo, si ha podido demostrarse que la inoculación de los vinos con el cultivo comercial *Lactobacter* sí ha tenido influencia sobre el momento de inicio y la duración total de la FML, y sobre el grado de degradación del ácido málico. Así, podemos apreciar que el descenso del ácido málico se adelantó 13 días en los tanques 7TN' y 8TN'. Este adelanto, se corresponde con el desarrollo temprano de la cepa comercial *Lactobacter*, que es la responsable de la FML. En el resto de tanques se aprecia que la rapidez y el grado de degradación de ácido málico están relacionadas con las concentraciones de *O. oeni* autóctonos, que alcanzan poblaciones máximas de 1.10^8 ufc mL⁻¹ en la mayoría de los casos. La FML tarda en completarse 13 días más, como mínimo, en aquellos tanques que no han sido inoculados (Figura 32)

El resultado más sorprendente de este trabajo ha sido el aislamiento exclusivo de *O. oeni*, cuando normalmente a lo largo de toda la vinificación aparecen otras especies pertenecientes a otros géneros (*Lactobacillus*, *Leuconostoc* o *Pediococcus*) (Riberéau-Gayon *et al.*, 2000). Ello puede deberse a que las vinificaciones se realizaron en una planta piloto, en pequeños volúmenes y con equipamiento y modo de operar muy distintos a los que se encuentran en condiciones industriales. La mayor limpieza de los equipos y el control más cuidadoso del proceso pueden explicar esta menor diversidad de especies.

Aunque se han descrito varias especies responsables de realizar la FML en vinos (*L. plantarum*, *L. casei*, *Pediococcus parvulus* y *Oenococcus oeni*) (Edwards y Jensen, 1992; Davis *et al.*, 1986b; Izuagbe *et al.*, 1985; Juhasz, 1994; Kosseva *et al.*, 1998; Patarata *et al.*, 1994; Sieiro *et al.*, 1990), en general es *O. oeni* la BL mejor adaptada para llevar a cabo este proceso en las condiciones propias del vino (bajos niveles de nutrientes, bajos pH y elevadas concentraciones de etanol del vino) (Kunkee, 1991; Wibowo *et al.*, 1985), y por ello es la que más frecuentemente se aísla durante la FML. Esto se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos en nuestros experimentos ya que el único microorganismo aislado tanto en los tanques inoculados como en los que se produjo fermentación espontánea fue *O. oeni*. El crecimiento de *O. oeni* en vino es un proceso complejo y presenta distintas fases durante la

FA, FML y conservación tras la FML (Davis *et al*, 1986). En vinos tintos se pueden necesitar desde varias semanas a meses para obtener el número apropiado de células capaces de degradar de manera eficiente el ácido málico presente. Por ello, se ha generalizado el uso de cultivos malolácticos que permiten acelerar este proceso y realizarlo con bacterias de metabolismo conocido por lo que se disminuyen los riesgos de que se produzcan compuestos no deseables, como las aminas biógenas.

En este estudio se aplicaron en paralelo las técnicas de FISH y recuento en placa para observar la evolución de las especies de BA y BL a lo largo de la vinificación. Los resultados resultaron semejantes, con la diferencia de que los recuentos fueron mayores en el caso del FISH, como ya apreciamos en el apartado anterior. Cuando se usó FISH para la identificación de las colonias de BA aisladas sobre placas y se comparó el resultado obtenido con los de las otras dos técnicas utilizadas (16-ARDRA en el caso de de BA y PCR específica en el caso de BL), se obtuvieron los mismos resultados.

Por todo ello, podemos afirmar que FISH es una técnica lo suficientemente potente como para ser utilizada para conocer el estado microbiológico de los vinos, de una forma rápida y fiable y además es una tecnología cuya transferencia a la bodega es relativamente fácil.

4.5.3 Estudio de la evolución de las poblaciones de BL y BA en vinificaciones de laboratorio con distintas concentraciones de SO₂

Se llevó a cabo un estudio para ver cómo afectaba la adición de distintas concentraciones de SO₂, aplicado en forma de K₂S₂O₅, a la dinámica de las poblaciones de BA y BL en vinificaciones de laboratorio. Para ello, se empleó la metodología descrita en el apartado **3.7.3**.

El pH inicial del mosto de Tempranillo fue de 3.49, la densidad inicial de 1094 y la acidez inicial de 5.62 g L⁻¹ expresada en ácido tartárico. El descubado se produjo el día octavo a una densidad de 994 el pH entre 3.6-3.68 y la acidez total tras el descubado fue de 6 g L⁻¹ para el control, 6.37 g L⁻¹ para 140 mg L⁻¹ de sulfuroso y 6.9 g L⁻¹ para 300 mg L⁻¹ de K₂S₂O₅. La evolución de la temperatura (°C) y de la densidad a lo largo de la vinificación del mosto control se muestra en la Figura 34.

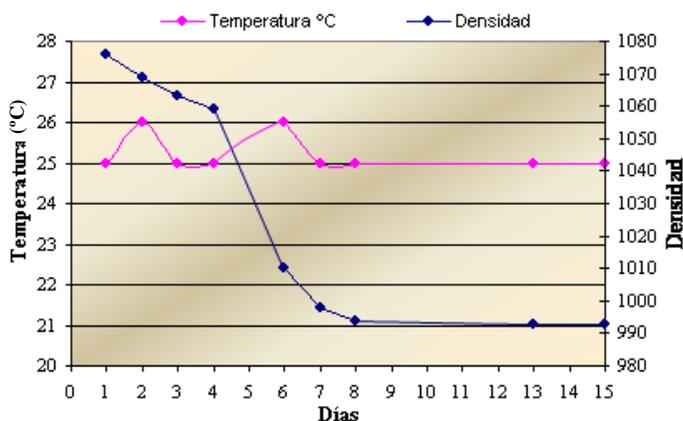


Figura 34. Evolución de la densidad y la temperatura durante la vinificación mosto control.

Como se puede apreciar la temperatura es bastante uniforme a lo largo de toda la vinificación, variando en apenas 1°C. No se esperaban aumentos importantes de temperatura, aunque esto es lo que sucede en condiciones industriales cuando no se controla este parámetro, debido a que la vinificación se realizó en pequeños volúmenes en el laboratorio, por lo que el calor generado por la actividad metabólica de las levaduras rápidamente se difundió al medio ambiente, manteniéndose la temperatura bastante estable. La densidad disminuye lentamente durante los 4 primeros días pero luego experimenta un descenso mucho más rápido como consecuencia de la elevada concentración de levaduras, que se han desarrollado durante los primeros días (datos no mostrados por no ser objeto de este trabajo el seguimiento de las levaduras).

Las poblaciones viables de BL y BA se evaluaron mediante siembra en placa de las muestras recogidas, de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.1.2 de Material y Métodos, y las cepas aisladas sobre estas placas se identificaron mediante 16S-ARDRA y FISH. En ninguno de los muestreos realizados se aislaron BL. Sin embargo, sí que se aislaron BA tanto en el medio propio de este grupo (MA) como en los medios de aislamiento de BL (MRSm y MLO). Como se observó que los recuentos de BA en los medios destinados a BL eran ligeramente superiores a los del medio MA, se utilizaron los datos obtenidos sobre estos medios para describir la evolución de las BA durante las vinificaciones en laboratorio. En paralelo, también se realizó un seguimiento directamente de las muestras fermentadas mediante FISH de la población global de BA, utilizando para ello la sonda AABr.

En las Figuras 35 y 36 se puede apreciar la evolución de las poblaciones viables de BA obtenidas en los medios MRSm y MLO. Como los resultados de los recuentos obtenidos en ambos medios difieren ligeramente, siendo algo superiores en el segundo, se va a describir la evolución de las BA cultivables utilizando los recuentos obtenidos en MLO. En el vino control se observa que durante el primer día la población de BA experimenta un ligero y corto aumento. Sin embargo desde ese momento la población va disminuyendo, primero lentamente hasta el 4º día y luego bruscamente (casi 3 órdenes de magnitud) hasta el 7º día, en el que se encuentran concentraciones de $5 \cdot 10^2$ a $2 \cdot 10^3$ ufc mL⁻¹ (según el medio de cultivo considerado). Tras 22 días desde el comienzo del experimento, se detectan concentraciones residuales de $1 \cdot 10^2$ ufc mL⁻¹, lo que nos informa de que bajos niveles de estas bacterias son capaces de resistir en vino tras la FA, como ya se observó que ocurría durante las vinificaciones industriales descritas en el apartado 3.5.1. Las pequeñas variaciones en las concentraciones de BA observadas al comparar las Figuras 35 y 36 son consecuencia de variaciones de recuperación de células en los medios MRSm y MLO, observándose en general mayores concentraciones de colonias sobre éste último, como ya hemos comentado. La razón que explique los recuentos más elevados en MLO puede ser el que éste es un medio más rico en nutrientes y de pH más bajo que el MRSm, por lo que presenta mejores condiciones para el desarrollo de las bacterias en general y particularmente de las acidófilas como las BA.

La dinámica poblacional del mosto control se correlaciona perfectamente con la evolución de la fermentación, la cual podemos deducir a partir de las variaciones en la densidad. Durante los 4 primeros días la tasa de fermentación es baja, y por ello la formación de etanol y de CO₂ también, estos bajos niveles de etanol y CO₂ no parecen tener un efecto demasiado negativo sobre la población de BA, ya que la concentración de las mismas al cabo de 4 días de iniciada la FA es muy similar a la encontrada en mosto ($\approx 10^5$ ufc mL⁻¹). Desde el cuarto al séptimo día la tasa de fermentación se multiplica por 2.4 veces respecto a la de los 4 primeros días, coincidiendo este intervalo con la fermentación tumultuosa. En este periodo se consigue la máxima producción de etanol y de CO₂ a partir de la fermentación de los azúcares por las levaduras, que están en su máxima concentración (datos no mostrados). Estas condiciones de anaerobiosis y de alta concentración de etanol propiciaron la disminución brusca de la población de BA pero no su total desaparición. Durante el periodo comprendido entre el séptimo y el vigésimo segundo día la fermentación está prácticamente paralizada como lo demuestra la pequeña variación de la densidad; es decir los azúcares se han agotado y

por ello los incrementos de etanol y CO_2 son muy pequeños, por lo que las BA que han logrado resistir hasta el séptimo día se mantienen en baja concentración. Por tanto, este experimento nos muestra exclusivamente el efecto de la fermentación alcohólica sobre las BA. En los otros dos experimentos en los que se trabaja con dos concentraciones diferentes de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ se aprecia un descenso más pronunciado de la población de BA durante los 4 primeros días de la FA, sin embargo este descenso se acentúa en el intervalo entre el cuarto y el séptimo día, al igual que ocurre con el experimento control, aunque de forma más brusca que en éste y proporcional a la dosis de metabisulfito empleada. Esto es particularmente visible en la vinificación tratada con 300 mg L^{-1} de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$. En las muestras correspondientes al día 22 ya no se detectó ninguna BA en los vinos a los que se le adicionó metabisulfito, mientras que todavía existían en muy baja concentración $1.10^2 \text{ ufc mL}^{-1}$ en el vino control.

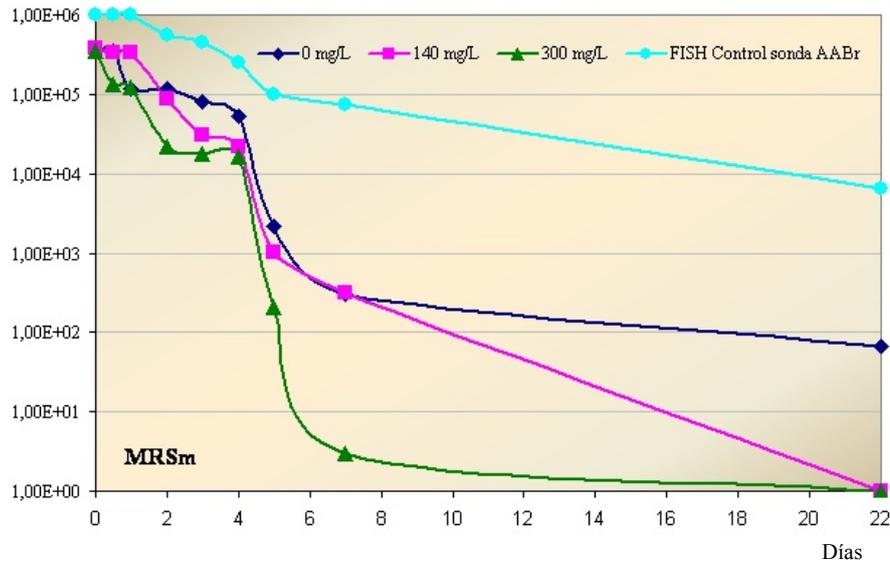


Figura 35 Evolución de BA en las vinificaciones realizadas con distintas dosis de $K_2S_2O_5$. En el eje de ordenadas las unidades representan cél. mL^{-1} para FISH realizado en vino control, y ucf mL^{-1} para el resto de líneas que describen los recuento en medio MRSm.

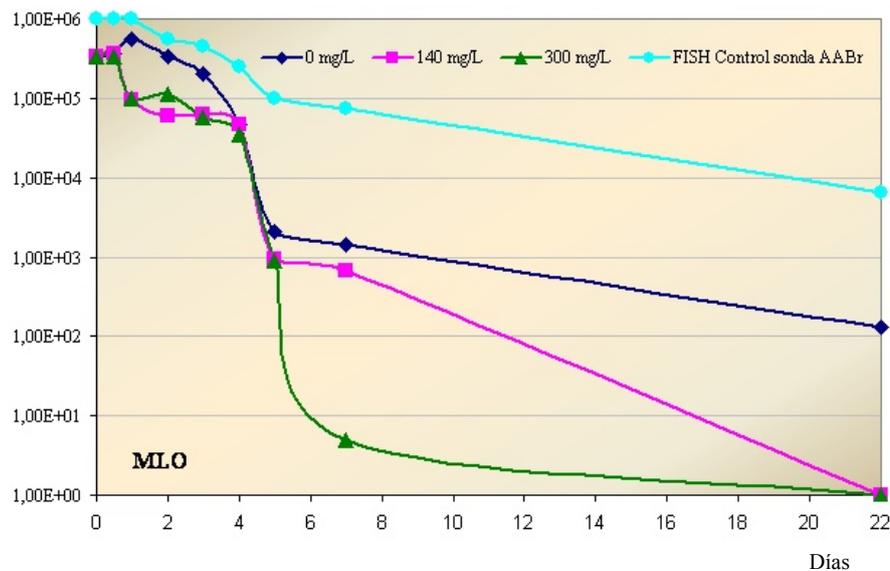


Figura 36. Evolución de BA en las vinificaciones realizadas con distintas dosis de $K_2S_2O_5$. En el eje de ordenadas las unidades representan cél. mL^{-1} para FISH realizado en vino control, y ucf mL^{-1} para el resto de líneas que describen los recuento en medio MLO.

Al haber partido de un mosto inicial idéntico, procedente de la misma variedad de uva y prensada en las mismas condiciones, se demuestra que las diferencias en las evoluciones mostradas por las BA son debidas a las diferentes concentraciones de $K_2S_2O_5$ empleadas. El SO_2 formado a partir del metabisulfito tiene un efecto bactericida, que viene a sumarse al efecto nocivo del incremento del etanol y de la progresiva anaerobiosis. Este efecto es más lento de lo que cabría esperar, ya que 7 días tras su adición, aún se detectan BA, incluso a concentraciones de metabisulfito de 300 mg L^{-1} .

Cuando se comparan los resultados obtenidos por recuento en placa y los obtenidos mediante el uso de FISH aplicado directamente a las muestras de vinificación, se observa que los recuentos son siempre mayores con FISH, aunque las diferencias entre ambos recuentos son mucho más elevadas a partir del 7º día. Millet y Lonvaud-Funel (2000) también apreciaron que las diferencias de recuento empleando recuentos en placa y epifluorescencia directa (DEFT) se acentuaban con el tiempo transcurrido desde la inoculación de las BA en vino. La técnica de recuento directo (DEFT) distingue entre microorganismos activos o inactivos basándose en la capacidad que tienen microorganismos metabólicamente activos (de hidrolizar un sustrato produciendo así fluorescencia detectable por microscopía de fluorescencia). Estos autores aplicaron ambas técnicas para establecer la viabilidad de las bacterias tras la FML y posterior sulfitado del vino, encontrando una reducción notablemente mayor de las bacterias capaces de desarrollarse sobre placas que de las bacterias vivas fluorescentes. La explicación que ellos dan a este hecho es que el sulfitado afecta mucho más a la capacidad de crecer a las células que a su capacidad para mantenerse viables. Esto es lo que nosotros observamos cuando comparamos los recuentos de viables con el recuento por FISH, técnica que se basa en la cantidad de ARNr existente en la célula diana de la sonda desarrollada. Cuanto menor es esa cantidad la célula está metabólicamente menos activa, por consiguiente menor es la señal de hibridación fluorescente y menor el recuento de células viables.

El recuento y la posterior identificación (mediante 16S ARDRA y FISH) de las diferentes colonias aparecidas en placa permitieron establecer el efecto del metabisulfito sobre las diferentes especies de BA. Los resultados de los recuentos obtenidos en MRSm y MLO se presentan en la Figura 37. Lo primero que llama la atención al comparar las gráficas de recuentos en MRSm y MLO correspondientes a las mismas condiciones, es que, además de obtenerse recuentos más elevados, también se evidencia una mayor diversidad de especies en

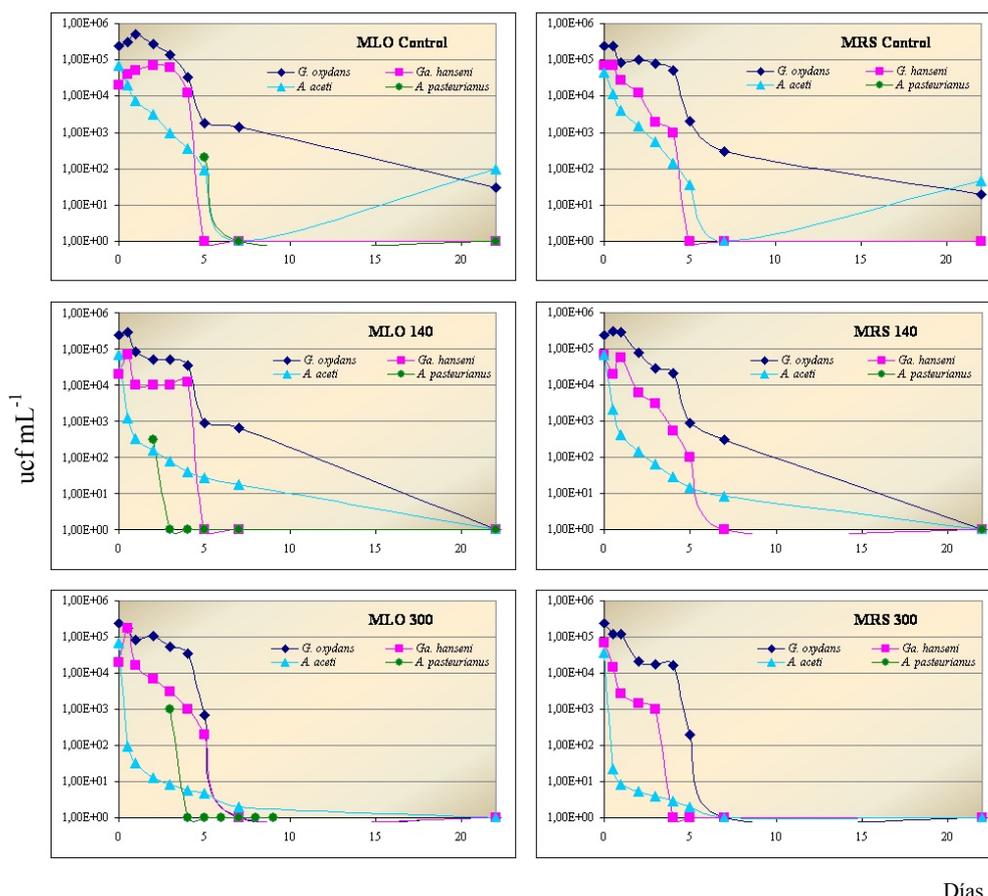
este último. Así mientras que sobre MLO se encontraron cuatro especies: *Ga. hansenii*, *G. oxydans*, *A. aceti* y *A. pasteurianus*, sobre MRSm solo las tres primeras. Además, las concentraciones de cada una de ellas en los distintos momentos son aproximadamente un orden de magnitud mayor en MLO. La razón de los recuentos más elevados puede ser el que es un medio más rico en nutrientes y de pH más bajo que el MRSm, por lo presenta mejores condiciones para el desarrollo de las bacterias en general y particularmente de las acidófilas como las BA. Por esta razón, se comenta la evolución de especies sometidas a distintas concentraciones de $K_2S_2O_5$ basándonos en los datos obtenidos sobre MLO. En el experimento control, al cual no se había adicionado $K_2S_2O_5$, las especies presentes en mosto son *G. oxydans*, *A. aceti*, y *Ga. hansenii* en orden decrecientes de concentraciones. Las dos especies de *Gluconobacter* experimentan un ligero aumento de su número, que dura 1 día en el caso de *G. oxydans*, y 4 en el caso de *Ga. hansenii*, para sufrir posteriormente un descenso importante que se prolonga hasta el final de la FA. Posteriormente, esta tendencia a la disminución continúa, aunque más moderada en el caso de *G. oxydans*, de manera que al final del experimento se encuentran valores de unas 50 ufc mL^{-1} de esta especie, mientras que no se detectan células cultivables de *Ga. hansenii*. *A. aceti*, que se presenta en elevada concentración en mosto, sufre una disminución continua a lo largo de toda la vinificación, aunque a día 22 todavía se detectan concentraciones residuales de $1.10^2 \text{ ufc mL}^{-1}$. Como se deduce de lo anterior, el comportamiento de estas especies es diferente, así mientras que las especies de *Gluconobacter* presentan una cierta capacidad de desarrollarse durante los primeros momentos de la vinificación, no ocurre lo mismo con *A. aceti* cuya población se reduce rápidamente. La posible explicación de este comportamiento diferencial puede hallarse en el hecho de que las especies del género *Gluconobacter* tienen mayor capacidad de utilización de los azúcares que *Acetobacter*, que utiliza preferencialmente el etanol, como ya se comentó en el apartado 3.5.1, por lo que tienen condiciones más ventajosas de crecimiento hasta que existen azúcares en el medio. Una vez agotados los azúcares *Ga. hansenii* desaparece por completo, mientras que quedan poblaciones residuales de 50 ufc mL^{-1} de *G. oxydans*. Aunque según Joyeux *et al.*, (1984), es difícil aislar especies del género *Gluconobacter* en vinos, probablemente debido a la elevada sensibilidad frente al etanol, en este trabajo se ha aislado un número bastante elevado de cepas de *G. oxydans* al final de la FA. Esta especie ha sido identificada previamente como especie predominante en uvas sanas por Joyeux *et al.*, (1984) y Drysdale y Fleet (1988). *A. aceti* muestra un desarrollo moderado

tras la FA, de manera que pasa de no ser detectable a valores de aproximadamente 10^2 ufc mL^{-1} . El hecho de que no se hayan detectado colonias cultivables desde el final de la FA hasta el día 22, no significa que no existan estas bacterias en estado viable pero no cultivable, a la espera de condiciones que les permitan la recuperación de su capacidad de multiplicarse. Millet y Lonvaud-Funel (2000) ya demostraron este comportamiento de las BA en un vino cual se le proporcionó aireación, siendo este factor el que permitió la recuperación del estado cultivable de las células. Se detectaron bajos niveles de *A. pasteurianus* durante la fermentación tumultuosa, posiblemente esta especie estaba presente en las muestras de inicio de FA pero su presencia no fue detectada en las muestras porque las diluciones utilizadas para hacer los recuentos fueron demasiado altas para “cazar” especies presentes en baja concentración. Esta explicación se apoya en el hecho de que *A. pasteurianus* sí se ha puesto de manifiesto en los primeros días de las vinificaciones con $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, en los resultados correspondientes al apartado 3.5.1 en los que se muestra la presencia de esta especie en mostos y durante la FA, y en lo descrito por otros autores que también la encuentran en los primeros días de la FA (Lafon-Lafourcade, 1983).

En las vinificaciones realizadas con $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ aparecen las mismas especies que en la fermentación realizada sin este compuesto, sin embargo la evolución de las mismas es algo diferente, sobre todo durante los primeros días de la FA. Así, durante los primeros 4 días no se aprecia aumento de las poblaciones de *G. oxydans* ni de *Ga. hansenii*, sino más bien una estabilización de las mismas en el caso de 140 mg L^{-1} de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, o una franca disminución en el de 300 mg L^{-1} . *A. aceti* también sufre una disminución más drástica que la de las otras especies en presencia de metabisulfito, por lo que parece más sensible a este producto. Este comportamiento concuerda con el que describen Swings *et al.*, (1992) y González *et al.*, (2005).

La adición de metabisulfito en las dos concentraciones ensayadas impide el crecimiento de BA en fases tardías de la vinificación, no detectándose ningún tipo cultivable en las últimas muestras de los experimentos (22 días).

La evolución de las especies deducida a partir del medio MRSm muestra una tendencia semejante a la observada en MLO, aunque las concentraciones obtenidas para casi todas las especies crecidas son menores.



Días

Figura 37. Evolución de las especies de BA a lo largo de la FA de mostos tratados con diferentes concentraciones de $K_2S_2O_5$ (140 y 300 $mg L^{-1}$).

La selección de las dosis adecuadas de SO_2 para prevenir el picado acético en el vino, siempre son objeto de controversia debido a que el SO_2 puede encontrarse en vino en forma libre y en forma combinada, siendo diferentes los efectos antisépticos de ambas formas. La forma libre consiste en SO_2 molecular, bisulfato e iones sulfito; la forma molecular es la más activa en términos antimicrobianos, pero a los pH normales del vino sólo un 5% de SO_2 libre se encuentra en forma molecular (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). La fracción combinada depende de la presencia en el vino de sustancias capaces de unirse este producto, como acetaldehído y otros compuestos cetónicos. Por ello, la misma dosis de SO_2 añadida a vinos diferentes puede tener distintas capacidades protectoras. Se ha demostrado que las BA pueden

crecer en vino conteniendo 20 mg L^{-1} de SO_2 libre (Joyeux *et al* 1984), de manera que los niveles de SO_2 utilizados normalmente en vino no siempre son capaces de inhibir estas bacterias (Drysdale y Fleet, 1988; Watanabe y Lino, 1984). Drysdale y Fleet (1988) encontraron que se necesita más de 100 mg L^{-1} de SO_2 total para inhibir el crecimiento de especies de *Acetobacter* en mosto e incluso se ha descrito que niveles mucho más altos (250 mg L^{-1}) de SO_2 libre no fueron suficientes para eliminar completamente las BA de barricas de madera (Wilker y Dharmadhikari, 1997).

5. Discusión general

El interés por conocer la microbiota asociada al proceso de vinificación ha sido de gran interés para los investigadores durante los últimos 30 años. Se han desarrollado muchas metodologías que han ayudado a esclarecer qué especies existen, cuáles son sus dinámicas poblacionales y qué consecuencia tienen éstas sobre las características del vino.

La identificación de la microbiota propia de la elaboración de los vinos usando métodos tradicionales, basados en el estudio de las características bioquímicas y fisiológicas de los microorganismos, es laboriosa y no siempre lleva a resultados claros y fiables. La incorporación de sistemas miniaturizados (API 50 CHL) para la identificación de estos microorganismos facilitó el trabajo, pero no mejoró la imprecisión de las identificaciones (Jensen y Edwards, 1991; Pardo et al., 1988, Riberéau-Gayon et al., 2000). Posteriormente, se introdujeron métodos de biología molecular que han permitido mejorar notablemente el grado de precisión en las identificaciones y han permitido también el desarrollo de métodos de detección molecular.

No todos los métodos moleculares desarrollados tienen las mismas aplicaciones, así mientras unos son útiles para la detección directa de microorganismos diana en un sustrato, otros sirven para la identificación a nivel de especie, y otros para la discriminación a nivel de cepa. Para una mayor información sobre este tema se recomienda la relectura del apartado 15.1 de la Introducción.

En este trabajo se ha pretendido desarrollar herramientas que permitan fundamentalmente la detección y la identificación de BL y BA del entorno enológico. Las técnicas desarrolladas para la detección han sido FISH y PCR específica, pero también se han usado para la identificación de colonias aisladas a partir de muestras de vinificación. La técnica 16S-ARDRA, ya utilizada previamente por otros autores para la identificación de BL y BA del vino (González *et al.*, 2005a Poblet *et al.*, 2006; Rodas *et al.*, 2003; Rodas *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2000), se ha utilizado también en este trabajo como instrumento de validación de las otras dos técnicas desarrolladas. La concordancia en la identificación obtenida con las tres técnicas nos permite asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos por FISH y PCR específica. Estas dos últimas técnicas son muy útiles para la detección de especies “diana” durante la vinificación, y desde ese punto de vista muchos autores han desarrollado sistemas de PCR específica para la detección de especies alterantes del vino, tales como *Brettanomyces bruxellensis* y *Pediococcus damnosus* (Contreras *et al.*, 2008; Delaerche *et al.*, 2004; Gindreau *et al.*, 2001; Ibeas *et al.*, 1996). Aunque existen menos

trabajos, también algunos autores han desarrollado técnicas de FISH para la detección de levaduras (Stender *et al.*, 2001) y de BL de origen enológico, siendo éstas últimas técnicas las presentadas en este trabajo y en un artículo publicadas previamente (Blasco *et al.*, 2003). La técnica de FISH se revela como una de las más prometedoras porque permite identificar y cuantificar simultáneamente varias especies directamente del vino, y además es una tecnología perfectamente trasladable a bodega porque requiere un equipamiento mínimo.

Las ventajas de la técnica de FISH sobre las técnicas de cultivo convencionales para la enumeración y detección de BL y BA son: a) rápida obtención de resultados cuantitativos, aproximadamente en 6 horas, al no requerirse el aislamiento a partir de las muestras; b) amplio rango de detección, tan amplio como el número de sondas utilizadas contra las especies diana; c) la posibilidad de detecciones simultáneas de diferentes especies en la misma muestra y d) bajo coste relativo por experimento que oscila entre 0.45 a 3.0 € por muestra, dependiendo del número simultáneo de muestras procesadas. La rapidez y sencillez de esta técnica la hace útil para el seguimiento de las poblaciones de bacterias alterantes durante el proceso de producción del vino y permiten la rápida toma de medidas de control de estas poblaciones antes de que los efectos del crecimiento de las mismas de lugar a cambios organolépticos perceptibles. La pérdida de tiempo en la aplicación de un remedio marca la diferencia entre el éxito de la corrección y la ruina del vino obtenido. Las técnicas de FISH no solamente sirven para el seguimiento de las especies alterantes sino también para estimar la probabilidad de que se realice la FML por bacterias malolácticas autóctonas o para monitorizar la evolución de un cultivo seleccionado.

Otros autores han aplicado las técnicas de FISH para el seguimiento de BL en otros entornos diferentes del vino pero relacionados con la fabricación de alimentos. Así por ejemplo, se han empleado para identificar poblaciones de BL en cultivos iniciadores usados para la fabricación de productos lácteos (Matte-Tailliez *et al.*, 2001; Olsen *et al.*, 2007) y en alimentos tales como leche, queso y carne (Cocolin *et al.*, 2007; Matte-Tailliez *et al.*, 2001). Sin embargo, no se conoce ninguna publicación anterior a este trabajo en el que se haya abordado el desarrollo de estas técnicas para estudiar la evolución de las bacterias del vino con la excepción del publicado por nosotros (Blasco *et al.*, 2003).

Cuando las técnicas de FISH o PCR específica se aplican a la identificación de las colonias aparecidas sobre placas de aislamientos podemos simplificar la obtención de

resultados sobre la evolución de poblaciones cultivables de distintas especies. Ello se debe a que la identificación mediante el método 16S-ARDRA es algo más largo y complejo. Además, se ha demostrado en este trabajo que los resultados obtenidos con cualquiera de estas tres técnicas son semejantes.

Sin embargo, es interesante que los estudiosos de la microbiota del vino dispongan de varias metodologías para la identificación y cuantificación entre las que puedan elegir en función de los objetivos que persigan y del equipamiento y presupuesto del que dispongan, ya que no es lo mismo trabajar con la infraestructura de una bodega que con la de laboratorio de investigación, ni tampoco son semejantes los objetivos que se persiguen en diferentes estudios. Además, aunque las técnicas de detección de FISH y PCR específica tengan la ventaja de la rapidez en la obtención de resultados, tienen como principal limitación el que no pueden detectar aquellas especies para las que no se han desarrollado “dianas” por desconocimiento de su existencia previa en el sustrato objeto de estudio. Además la PCR específica no permite cuantificación, a menos que se trate de una PCR a tiempo real. Para obviar estos problemas, es útil el aislamiento en placa, que nos permite el recuento y la identificación de los microorganismos viables existentes en la muestra mediante técnicas como 16S-ARDRA o secuenciación. En nuestro caso ocurrió que gracias al aislamiento en placa de las muestras industriales se encontraron las especies *G. frateurii* y *A. malorum* que previamente no se habían descrito en vino. *A. malorum* se encontró por primera vez en manzanas podridas (Cleenwerck *et al.*, 2002) mientras que *G. frateurii* se aisló inicialmente de fresas (Moonmangmee *et al.*, 2000).

Como se ha visto a lo largo de este trabajo las técnicas de FISH, PCR específica, y 16S-ARDRA se pueden aplicar a aislados de muestras naturales, tanto para controlar la evolución de las poblaciones de BL y BA a lo largo de una vinificación, como para conocer los efectos de distintas condiciones enológicas sobre las poblaciones de BL o BA. En el trabajo presentado se ha demostrado que la técnica más apropiada para estos objetivos sería FISH directa sobre mosto o vino, ya que permite la detección de las especies y el recuento de las células vivas, reduciendo el esfuerzo y el tiempo necesarios para la obtención de resultados, sin reducir la fiabilidad, tal y como se ha demostrado.

La comparación de las dinámicas de poblaciones de BA que hemos llevado a cabo en este trabajo nos mostró *G. oxydans* se encontraba a lo largo de toda la vinificación, especialmente

al principio que es el momento donde más abundan los azúcares que son su fuente de C preferidas, pero también en vinos acabados y trasegados aunque en bajas concentraciones. La otra especie de BA que aparecía en todas las vinificaciones analizadas es *A. aceti*. Esta especie se encontraba en mosto en concentraciones más bajas que *G. oxydans* y durante la FA su concentración disminuía aunque su proporción relativa con *G. oxydans* se incrementaba. En vinos acabados son las dos únicas especies que se han encontrado. *Ga. hansenii* y *A. pasteurianus* solo se han detectado en vinificaciones industriales, principalmente durante los primeros días de la FA pero también al final de la misma. También se encontraron en vinificaciones industriales dos especies no descritas previamente en vinos, *G. frateurii* en los primeros momentos la FA y *A. malorum* en vinos trasegados, ambas dos en bajas proporciones respecto a otras especies de BA.

Como se ha demostrado en este trabajo el medio de cultivo empleado para hacer los aislamientos de muestras de vinificación influye tanto en el número como en la diversidad de especies obtenidas en las placas por lo que es difícil comparar los resultados publicados por diferentes laboratorios. En vinificaciones a escala de planta piloto y laboratorio la eliminación de BA mediante el uso de SO₂ se consigue con mucha mayor eficacia, posiblemente porque las condiciones que potencian su combinación con otras sustancias o su eliminación por arrastre de CO₂ son mucho menos acusadas que en condiciones industriales. Se ha observado que el efecto antiséptico del SO₂ no es instantáneo y que tarda varios días en disminuir la población de las BA capaces de crecer. Sin embargo, por FISH y BacLight® se ha demostrado que quedan concentraciones de células viables no cultivables bastante mayores de aquellas que son capaces de desarrollarse en placa. Estas poblaciones pueden retornar a su estado cultivable cuando encuentran condiciones adecuadas, oxígeno o reducidos niveles de SO₂ (Millet y Lonvaud-Funel 2000), pudiendo dar lugar a la acetificación de los vinos.

La aplicación de FISH y PCR específica para el seguimiento de BL mostró únicamente la presencia de *O. oeni* en las vinificaciones en planta piloto (Resultados y discusión 3.5.2) pero no en las de laboratorio (Resultados y discusión 3.5.3). Aunque carecemos de datos de evolución de BL en condiciones industriales, era de esperar, como en el caso de las BA, que en estas últimas condiciones hubiéramos encontrado una mayor diversidad, como efecto del mayor volumen vinificado y del distinto nivel de asepsia utilizado en la vinificación.

6. Conclusiones

Se desarrollaron con éxito sondas marcadas con fluorocromos que resultaron específicas para la identificación de 13 especies de bacterias lácticas además del género *Leuconostoc* y 5 bacterias acéticas además de una sonda general para identificar bacterias pertenecientes a la familia *Acetobacteraceae*.

Las sondas funcionaron perfectamente en la identificación y cuantificación de bacterias tanto acéticas como lácticas provenientes de cultivos puros o mixtos y muestras de mosto y vino.

Se pudieron realizar detecciones múltiples en una misma muestra debido al uso de sondas marcadas con diferentes fluorocromos.

El uso de hibridación en filtro permitió utilizar diferentes volúmenes a filtrar para ajustar a concentraciones de células apropiadas para el recuento.

Hemos aplicado con éxito la técnica de 16S-ARDRA para la identificación de BA a nivel de especie. Obtuvimos perfiles de bandas exclusivos para todas las especies testadas con la excepción del par *A. pasteurianus* / *A. pomorum* y el grupo *Ga. xylinus*, *Ga. europaeus*, *Ga. oboediens* y *Ga. intermedius*.

Los cebadores diseñados y empleados en nuestro trabajo para la detección e identificación de bacterias pertenecientes a la familia de *Acetobacteraceae*, fueron efectivos y fiables y se pudieron aplicar en el análisis de aislados del vino y muestras de éste.

Todas las técnicas desarrolladas en este trabajo consumen mucho menos tiempo que otras para distinguir entre especies como la hibridación AND-ADN o la secuenciación del 16S rADN.

La utilidad de las técnicas fue comprobada usando todas las técnicas para identificar los aislados del vino; éstas concordaron en los resultados de identificación, y se probó así que eran adecuadas para nuestros propósitos.

G. oxydans fue la especie de bacteria acética dominante al principio de las vinificaciones y *A. aceti* fue la especie dominante al final en todas las fermentaciones, se detectaron y aislaron algunas colonias de esta última especie capaces de permanecer hasta el final de la fermentación.

Fuimos capaces de enumerar mediante FISH y detectar mediante *nested* PCR las BA sin necesidad de cultivo previo, lo cual hace posible detectar la presencia de células viables no cultivables, acortando así el tiempo para aplicar medidas preventivas para evitar que el vino se estropee.

Se han encontrado aislados en vinos no descritos previamente en este gracias al uso de aislamiento en placa y secuenciación.

Las técnicas resultaron económicamente abordables desde el punto de vista de una bodega, con lo cual su aplicación real es eficiente.

7. Bibliografía

- Altschul, S. F., Gish, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. 1991.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. **215**, 403-410
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. y Stahl, D. A. 1990a.** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**, 1919-1925
- Amann, R. I., Krumholz, L. y Stahl, D. A. 1990b.** Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*. **172**, 762-770
- Amann, R. I., Ludwig, W. y Schleifer, K. H. 1995.** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*. **59**, 143-169
- Amann, R., Snaidr, J., Wagner, M., Ludwig, W. y Schleifer, K. H. 1996.** *In situ* visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *Journal Bacteriology*. **178**, 3496-3500
- Amerine, M. A. y Kunkee, R. E. 1968.** Microbiology of winemaking. *Annual Review of Microbiology*. **22**, 323-357
- Amerine, M. A., Berg, H. W., Kunkee, R. E., Ough, C. S., Singleton, V. L. y Webb, A. D. 1982.** Technology of wine making. (Ed.). Inc. Westport, Connecticut.
- Anónimo. 1999.** Productos derivados de la uva, aguardientes y sidras. Métodos oficiales de análisis. Panreac Química. Barcelona.
<http://www.panreac.com/new/esp/publicaciones/publicaciones01.htm>
- Arena, M., Fiocco, D., Manca de Nadra, M., Pardo, I., y Spano, G. 2007.** Characterization of a *Lactobacillus plantarum* strain able to produce tyramine and partial cloning of a putative tyrosine decarboxylase gene. *Current Microbiology*. **55**, 205-210.
- Asai, T. 1971.** The classification and biochemistry of acetic acid bacteria. Kodansha Ltd. Tokyo.
- Barry, T., Collieran, C., Glennon, M., Dunican, L. y Gannon, F. 1991.** The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Applied*. **1**, 51-56
- Bartowsky, E. J. y Henschke, P. A. 1999.** Use of a polymerase chain reaction for specific detection of the malolactic fermentation bacterium *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) in grape juice and wine samples. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. **5**, 39-44

- Bartowsky, E. J., Xia, D., Gibson, R. L., Fleet, G. H. y Henschke, P. A. 2003.** Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. **36**, 307-314
- Beimfohr, C., Krause, A., Amann, R., Ludwig, W. y Schleifer, K. 1993.** *In situ* identification of *Lactococci*, *Enterococci* and *Streptococci*. *Systematic and Applied Microbiology*. **16**, 450-456
- Blasco, L., Ferrer, S. y Pardo, I. 2003.** Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. **225**, 115-123
- Bottari, B. Ercolini, D. Gatti, M. y Neviani E. 2006.** Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospect. *Applied and Microbiological Biotechnology*. **73**, 485-494
- Bousbouras, G. E. y Kunkee, R. E. 1971.** Effect of pH on malo-lactic fermentation in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. **22**, 121-126
- Buchanan, R. E. y Gibbons, N. E. 1984.** Family VI. *Acetobacteraceae*. En "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Vol. 1 (9th ed.). The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Bulygina, E. S., Gulikova, O. M., Dikanskaya, E. M., Netrusov, A. I., Tourova, T. P. y Chumakov, K. M. 1992.** Taxonomic studies of the genera *Acidomonas*, *Acetobacter* and *Gluconobacter* by 5S ribosomal RNA sequencing. *Journal of General Microbiology*. **138**, 2283-2286
- Bureau, G., Brun, D., Vignes, A., Maujean, A., Vesselle, G. y Feuillat, M. 1982.** Etude d'une microflore levurienne champenoise. *Connaissance de la Vigne et du Vin*. **16**, 15-32
- Carvalho, E., Costa, S., Franco, C. y Curvelo-Garcia, A. 2001.** Acidification of musts and wines. Application of L-tartaric, L-lactic and DL-malic acids. *Bulletin de la O.I.V.* **74**, 849-850743-751
- Caspritz, G. y Radler, F. 1983.** Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. Purification, properties, and distribution among bacteria. *Journal of Biological Chemistry*. **258**, 4907-4910
- Chalfan, Y., Goldberg, I. y Mateles, R. J. 1977.** Isolation and characterization of malo-lactic bacteria from Israeli red wines. *Journal of Food Science*. **42**, 939- 943
- Chenoll, E., Macián, M. C. y Aznar, R. 2006.** *Lactobacillus tuccei* sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from sausage. *Systematic and Applied Microbiology*. **29**, 389-395

Cleenwerck I., Vandemeulebroecke K., Janssens D., y Swings J. 2002. Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **52**, 1551-1558

Cocolin, L.; Diez, A.; Urso, R.; Rantsiou, K.; Comi, G.; Bergmaier, I.; Beimfohr, C. 2007. Optimization of conditions for profiling bacterial populations in food by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* **120**, 100-109

Contreras, A., Salinas, F., Ganga, A. y Martinez, C. 2008. Polymerase chain reaction confirmatory method for microbiological detection of *Brettanomyces bruxellensis* in wine. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* **16**, 308-319

Costantini, E., Campostrini, F., Arcara, P. G., Cherubini, P., Storchi, P. y Pierucci, M. 1996. Soil and climate functional characters for grape ripening and wine quality of "vino nobile di Montepulciano" (1996), www.soilmaps.it/download/zvo-nobile_montepulciano.pdf

Costello, P. J., Morrison, G. J., Lee, T. H. y Fleet, G. H. 1983. Numbers and species of lactic acid bacteria in wines during vinification. *Food Technology in Australia*. **35**, 14- 18

Costello, P. J., Monk, P. R. y Lee, T. H. 1985. An evaluation of two commercial *Leuconostoc oenos* strains for induction of malolactic fermentation under winery conditions. *Food Technology in Australia*. **37**, 21-23.

Costello, P. J. y Henschke, P. A. 2002. Mousy off-flavor of wine: Precursors and biosynthesis of the causative N-heterocycles 2-ethyltetrahydropyridine, 2-acetyltetrahydropyridine, and 2-acetyl-1pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176. *Journal of agricultural and food chemistry*. **50**, 7079

Daniel, P., De Waele, E. y Hallet, J. N. 1993. Optimisation of transverse alternating field electrophoresis for strain identification of *Leuconostoc oenos*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **38**, 638-641

Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T. H. y Fleet, G. H. 1985. Practical implications of malolactic fermentation: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*. **36**, 290-301

Davis, C. R., Wibowo, D., Lee, T. H. y Fleet, G. H. 1986a. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during fermentation and conservation of some Australian wines. *Food Technology in Australia*. **38**, 35-40

Davis, C. R., Wibowo, D., Lee, T. H. y Fleet, G. H. 1986b. Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. *Applied and Environmental Microbiology*. **51**, 539-545

Davis, C. R., Wibowo, D., Fleet, G. H. y Lee, T. H. 1988. Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. *American Journal of Enology and Viticulture*. **39**, 137-142

Delaherche, A., Claisse, O. y Lonvaud-Funel, A. 2004. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 910-915

De Bruyne K., Franz C. M. A. P., Vancanneyt M., Schillinger U., Mozzi F., Font de Valdez G., De Vuyst L., y Vandamme P. 2008. *Pediococcus argentinicus* sp. nov. from Argentinean fermented wheat flour and identification of *Pediococcus* species by *pheS*, *rpoA* and *atpA* sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **58**: 2909 - 2916.

De Bruyne, K., Schillinger, U., Caroline, L., Boehringer, B., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., Franz, C. M. A., y Vandamme, P. 2007. *Leuconostoc holzapfelii* sp. nov., isolated from Ethiopian coffee fermentation and assessment of sequence analysis of housekeeping genes for delineation of *Leuconostoc* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **57**, 2952-2959.

De Las Rivas, B., Marcobal, A. y Muñoz, R. 2004. Allelic diversity and population structure in *Oenococcus oeni* as determined from sequence analysis of housekeeping genes. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**, 7210-7219

De Ley, J. 1961. Comparative carbohydrate metabolism and a proposal for a phylogenetic relationship of the acetic acid bacteria. *Journal of General Microbiology*. **24**, 31-50

De Ley, J. y Schell, J. 1963. Deoxyribonucleic acid base composition of acetic acid bacteria. *Journal of General Microbiology*. **33**, 243-253

De Ley, J., Gillis, M. y Swings, J. Family VI. *Acetobacteraceae* Gillis and De Ley, 1980. En "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". **1984a**. en 267-278

De Ley, J., Swings, J. y Gosselé, F. Genus *Acetobacter* Beijerinck 1898, 215^{AL}. En "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". **1984b**. en 268-274

Delfini, C. y Formica, J. V. Wine Microbiology, Science and Technology. 2001. Dekker. New York.

Dellaglio, F., Felis, G. E. y Torriani, S. 2002. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for an Opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **52**, 285-287

- De Man, J.C., M. Rogosa y M.E. Sharpe. 1960.** A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, **23**: 130-135
- De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S. y Giudici, P. 2006.** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiology*. **23**, 809-813
- Dicks, L. M. T. y Van Vuuren, H. J. J. 1988.** Identification and physiological characteristics of heterofermentative strains of *Lactobacillus* from South African red wines. *Journal of applied bacteriology*. **64**, 505-513
- Dicks, L. M. T. y Van Vuuren, H. J. J. 1990.** Differentiation of *Leuconostoc* species by nicotinamide adenine dinucleotide-dependent D(-)-Lactic dehydrogenase profiles. *FEMS Microbiology Letters*. **67**, 9-14
- Dicks, L. M. T., Van Vuuren, H. J. J. y Dellaglio, F. 1990.** Taxonomy of *Leuconostoc* Species, Particularly *Leuconostoc oenos*, As Revealed by Numerical Analysis of Total Soluble Cell Protein Patterns, DNA Base Compositions, and DNA-DNA Hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **40**, 83-91
- Dicks, L. M. T. 1995.** Relatedness of *Leuconostoc* species of the *Leuconostoc* sensu stricto line of descent, *Leuconostoc oenos* and *Weissella paramesenteroides* revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns. *Systematic and Applied Microbiology*. **18**, 99-102
- Doyle, M. P. y Meng, J. 2006.** Bacteria in food and beverage production In: The Prokaryotes Vol. 3 Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.)
- Drysdale, G. S. y Fleet, G. H. 1985.** Acetic acid bacteria in some Australian wines. *Food technology Australia*. **37**, 17-20
- Drysdale, G. S. y Fleet, G. H. 1988.** Acetic acid bacteria in winemaking: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*. **39**, 143-154
- Drysdale, G. S. y Fleet, G. H. 1989.** The effect of acetic acid bacteria upon the growth and metabolism of yeast during the fermentation of grape juice. *Journal of applied bacteriology*. **67**, 471-481
- Drysdale, G. S. y Fleet, G. H. 1989.** The growth and survival of acetic acid bacteria in wines at different concentrations of oxygen. *American Journal of Enology and Viticulture*. **40**, 99-105

Du Plessis, H. W., Dicks, L. M. T., Pretorius, I. S., Lambrechts, M. G. y Du Toit, M. 2004. Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines. *International Journal of Food Microbiology*. **91**, 19-29

Dupuy, P. y Melamed, N. 1956. La croissance de *Lactobacillus arabinosus* dans le jus de raisin: influence du pH, de l'ethanol et d'un hydrolysate tryptique. *84^e Congrès des Sociétés savantes. Dijon*. pp. 263-274

Du Toit, W. J. y Lambrechts, M. G. 2002. The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. **74**, 57-64

Du Toit, W. J. y Pretorius, I. S. 2002. The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Annals of Microbiology*. **52**, 155-179

Edinger, W. D. y Splittoesser, D. F. 1986. Production by lactic acid bacteria of sorbic acid and alcohol, the precursor of the geranium odor compound. *American Journal of Enology and Viticulture*. **37**,

Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M. y Bottger, E. C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic acid research*. **17**, 7843-7853

Edwards, C. G., Haag, K. M., Collins, M. D., Hutson, R. A. y Huang, Y. C. 1998. *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: a spoilage organism associated with grape juice fermentations. *Journal of Applied Microbiology*. **84**, 698-702.

Edwards, C. G. y Jensen, K. A. 1992. Occurrence and characterization of lactic acid bacteria from Washington state wines: *Pediococcus* spp. *American Journal of Enology and Viticulture*. **43**, 233-238

Edwards, C. G., Collins, M. D., Lawson, P. A. y Rodriguez, A. V. 2000. *Lactobacillus nagelii* sp. nov., an organism isolated from a partially fermented wine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **50**, 699-702

Endo, A., Okada, S. 2008. Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 2195-2205.

Euzéby, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (1998-2008), <http://www.bacterio.cict.fr> or <http://bacterio.net>

Farías, M. E., Manca De Nadra, M. C., Rollán, G. C. y Strasser De Saad, A. M. 1993. Histidine decarboxylase activity in lactic acid bacteria from wine. *Vigne Vin*. **27**:, 191-199.

- Felis, G. y Dellaglio, F. 2007.** Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues Intestinal Microbiology*. **8**, 44-61
- Flanzy, C.** Enología: fundamentos científicos y tecnológicos. **2000.** Ed. Mundi Prensa. Madrid.
- Fleet, G. H.** The microorganisms of winemaking. Isolation, enumeration and identification. **1993.** En *Wine Microbiology and Biotechnology*. (Ed.), G. H. F. Hardwood Academic Publishers. Switzerland
- Frayne, R.F. 1986.** Direct analysis of the major organic components in grape must and wine using high performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.* **37**: 281-287.
- Franke, I. H., Fegan, M., Hayward, C., Leonard, G., Stackebrandt, E. y Sly, L. I. 1999.** Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **49**, 1681-1693
- Franke, I. H., Fegan, M., Hayward, C., Leonard, G. y Sly, L. I. 2000.** Molecular detection of *Gluconacetobacter sacchari* associated with the pink sugarcane mealybug *Saccharicoccus sacchari* (Cockerell) and the sugarcane leaf sheath microenvironment by FISH and PCR. *Fems-Microbiology-Ecology*. **31**, 61-71
- Franke, I. H., O'shea, M. G., Leonard, G. J. y Sly, L. I. 2005.** Design, development, and use of molecular priers and probes for the detection of *Gluconacetobacter* species in the pink sugarcane mealybug. *Microbial Ecology*. **50**, 128-139
- Frateur, J. 1950.** Trial on classification of *Acetobacter*. *Cellule*. **53**, 287-392
- Fuentes, L. E., Tapia, A., Jimenez, T., Mascarúa, M. A., Santoyo, Y., Caso, L. R., Romero, H. T., Cajica, M., León, D., Rosales, M., Fügeman, P. y Castillo, M. G. 2003.** Bacterias acéticas: Diversidad e interacción con las plantas. *Elementos: ciencia y cultura*. **49**, 47-51
- Fukaya, M., Iwata, T., Entani, E., Masai, H., Uozumi, T. y Beppu, T. 1985.** Distribution and characterization of plasmids in acetic acid bacteria. *Agriculture and Biological Chemistry*. **49**, 1349-1355
- García, M. J., Zuñiga, M. y Uruburu, F. 1992.** El metabolismo y el control de las bacterias lácticas en el vino. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. **32**, 233-268
- García, M. J., Zúñiga, M. y Uruburu, F. 1992.** Revisión: El metabolismo y el control de las bacterias lácticas en el vino. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. **32**, 233-268

Garvie, E. I. 1967. The Growth Factor and Amino Acid Requirements of the Genus *Leuconostoc*, including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp.nov.) and *Leuconostoc oenos*. *Journal of General Microbiology* **48**, 439-447

Gillis, M. 1978. Intra- and intergenetic similarities of the rRNA cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter*. *Antoine van Leeuwenhoek*. **44**, 117-118

Gillis, M. y De Ley, J. 1980. Intra and intergeneric similarities of the RNA cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **30**, 7-27

Gindreau, E., Walling, E., Lonvaud, y Funel A. 2001. Direct polymerase chain reaction detection of ropy *Pediococcus damnosus* strains in wine. *Journal-of-Applied-Microbiology*. **90**, 535-542.

Glöckner, F. O., Amann, R., Alfreider, A., Pernthaler, J., Psenner, R., Trebesius, K. y Schleifer, K. H. 1996. An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*. **19**, 403-406

Glöckner, F. O., Fuchs, B. M. y Amann, R. 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**, 3721-3726

González, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozes, N., Mas, A. y Guillamon, J. 2004. Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology*. **96**, 853-860

González, A., Guillamón, J. M., Mas, A. y Poblet, M. 2006. Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. **108**, 141-146.

González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A. y Guillamon, J. 2006b. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested PCR. *FEMS Microbiological Letters*. **254**, 123-128

González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A. y Guillamon, J. 2005a. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *International Journal of Food Microbiology*. **102**, 295-304

Gosselé, F., Swings, J., Kersters, K. y De, L. J. 1982. Numerical analysis of Frateur's phenotypic data on acetic acid bacteria. *Antonie-Van-Leeuwenhoek*. **48**, 289-95

Gosselé, F., Swings, J., Kersters, K. y De Ley, J. 1983. Numerical analysis of phenotypic features and protein gel electrophoregrams of *Gluconobacter asaii* 1935 emend.

mut. char. Asai, Iizuka and Komagata 1964. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **33**, 65-81

Guerrini, S., Mangani, S., Granchini, L. y Vincenzini, M. 2002. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Current Microbiology*. **44**,

Guerrini, S., Bastianini, A., Blaiotta, G., Granchi, L., Moschetti, G., Coppola, S., Romano, P. y Vincenzini, M. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. *International Journal of Food Microbiology*. **83**, 1-14

Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L. y Giudici, P. 2006. Characterization of acetic acid bacteria in "traditional balsamic vinegar". *International Journal of Food Microbiology*. **106**, 209-212

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*. **41**, 95-98

Hayman, D. C. y Monk, P. R. 1982. Starter culture preparation for the induction of malolactic fermentation in wine. *Food Technology in Australia*. **34**, 14-18

Heidelberg, J., O'Neill, K., Jacobs, D. y Colwell, R. 1993. Enumeration of *Vibrio vulnificus* on membrane filters with a fluorescently labeled oligonucleotide probe specific for kingdom-level 16S rRNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**, 3474-3476

Henick-Kling, T. Use of malolactic starter cultures in the winery. **1991**. Front Royal: University of Davis. Virginia. USA.

Henick-Kling, T. 1995. Control of malo-lactic fermentation in wine: energetics, flavour modification and methods of starter culture preparation. *Journal of Applied Bacteriology*. **79**, S29-S37

Hensiek, R., Krupp, G. y Stackebrandt, E. 1992. Development of diagnostic oligonucleotide probes for four *Lactobacillus* species occurring in the intestinal tract. *Systematic and Applied Microbiology*. **15**, 123-128

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. y Williams, S. T. 1994. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (9ª edición). Baltimore, Maryland.

Ibeas, J. I., Lozano, I., Perdignes, F. y Jimenez, J. 1996. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 998-1003

- Izuagbe, Y. S., Dohman, T. P., Sandine, W. E. y Heatherbell, D. A. 1985.** Characterization of *Leuconostoc oenos* isolated from Oregon wines. *Applied and Environmental Microbiology*. **50**, 680-684
- Jensen, K. A. y Edwards, C. G. 1991.** Modification of the API rapid CH system for characterization of *Leuconostoc oenos*. *American Journal of Enology and Viticulture*. **42**, 274-277
- Jones, G. V. y Davis, R. E. 2000.** Climate Influences on Grapevine Phenology, Grape Composition, and Wine Production. *American Journal of Enology and Viticulture*. **51**, 249-261
- Joyeux, A., Lonvaud-Funel, A. y Ribéreau-Gayon, P. 1984.** Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S. y Ribéreau-Gayon, E. 1994.** Metabolism of acetic acid bacteria in grape must: consequences on alcoholic and malolactic fermentation. *Sciences des Aliments*. **4**, 247-255
- Juhász, R. M. 1994.** Characterization of *Leuconostoc oenos* strains in Hungarian wines. *Acta Alimentaria*. **23**, 71-84
- Katsura, K., Kawasaki, H., Potacharoen, W., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. y Komagata, K. 2001.** *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the alpha-Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **51**, 559-563
- Kelly, W. J., Huang, C. M. y Asmundson, R. V. 1993.** Comparison of *Leuconostoc oenos* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**:, 3969-3972.
- Kerstens, K. y De Ley, J. 1975.** Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *Journal of General Microbiology*. **87**, 333-342
- Kim, J., Chun, J. y Han, H. U. 2000.** *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 1915-1919.
- Kim, B., Lee, J., Jang, J., Kim, J., y Han, H. 2003.** *Leuconostoc inhae* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **53**, 1123-1126.
- Kosseva, M., Beschokov, V., Kennedy, J. F. y Lloyd, L. L. 1998.** Malolactic fermentation in Chardonnay wine by immobilised *Lactobacillus casei* cells. *Process in Biochemistry*. **33**, 793-797

- Kretova, M. y Grones, J. 2005a.** Molecular analysis of 16S-23S spacer regions of *Acetobacter* species. *Folia Microbiologica*. **50**, 288-292
- Kretova, M. y Grones, J. 2005b.** Characterisation and identification of *Acetobacter* bacteria [Czech]. *Chemické Listy*. **99**, 144-149
- Kunkee, R. E. 1967.** Malo-lactic fermentation. *Advances in Applied Microbiology* **9**: 235-279
- Kunkee, R. E. y Goswell, R. W.** Table wines. **1977.** En "Alcoholic Beverages". Ah. Rose (Ed.). Academic Press. London. 321-385
- Kunkee, R. E. 1991.** Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making. *FEMS Microbiology Reviews*. **88**, 55-72
- Kunene, N. F., Geornaras I., von Holy, A. y Hastings, J. W.. 2000.** Characterization and Determination of Origin of Lactic Acid Bacteria from a Sorghum-Based Fermented Weaning Food by Analysis of Soluble Proteins and Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 1084-1092.
- Lafon-Lafourcade, S. y Joyeux, A. 1979.** Techniques simplifiées pour le dénombrement et l'identification des microorganismes vivants dans les mouts et les vins. *Connaissance de la Vigne et du Vin*. **13**, 295-310.
- Lafon-Lafourcade, S. y Joyeux, A. 1981.** Les bactéries acétiques du vin. *Bulletin de l'O.I.V.* **608**, 803-829
- Lafon-Lafourcade, S. 1983.** Wine and Brandy. En Biotechnology. (Eds.), H.-J. R. A. G. R. Vol.5. Verlag Chemie. Basel. 81-163
- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E. y Ribéreau-Gayon, P. 1983.** Occurrence of lactic acid bacteria during different stages of vinification and conservation of wines. *Applied and Environmental Microbiology*. **46**, 874-880
- Leisner, J. J., Vancanneyt, M., Goris J., Christensen H. y Rusul G. 2000.** Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen. nov., sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from chili bo, a Malaysian food ingredient. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **50**, 19-24.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. y Komagata, K. 2001.** Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp nov., *Acetobacter cibirongensis* sp nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. *Journal of General and Applied Microbiology*. **47**, 119-131
- Liu, J. y Gallander, J. F. 1983.** Effect of pH and sulfur dioxide on the rate of malolactic fermentation in red table wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. **34**, 44-46

- Liu, S. Q., Pritchard, G. G., Hardman, M. J. y Pilone, G. J. 1994.** Citrulline production and ethyl carbamate (urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchneri*. *American Journal of Enology and Viticulture*. **45:**, 235-242.
- Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D. y Villa, T. G. 1991.** Effect of climatic condition on yeast diversity in grape musts from Northwest Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*. **42**, 141-144
- Lonvaud-Funel, A., Biteau, N. y Fremaux, C. 1989.** Identification of *Leuconostoc oenos* with DNA probes. *Sciences des Aliments*. **9**, 533-541
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A. y Ledoux, O. 1991.** Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes. *Journal of*. **71**, 501-508
- Lonvaud-Funel, A. y Joyeux, A. 1994.** Histamine production by wine lactic acid bacteria: isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Bacteriology*. **77**, 401-407
- Lonvaud-Funel, A. 1999.** Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antoine van Leeuwenhoek*. **76**, 317-331
- Lopez, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Phister, T., Marshall, M., Vandergheynst, J. y Mills, D. 2003.** Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**, 6801-6807
- Maicas, S., Ferrer, S. y Pardo, I. 2002.** NAD(P)H regeneration is the key for heterolactic fermentation of hexoses in *Oenococcus oeni*. *Microbiology*, **148**, 325-332.
- Maicas, S., Gil, J.-V., Pardo, I. y Ferrer, S. 1999.** Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Research International*. **32**, 491-496
- Maicas, S., Natividad, À., Ferrer, S. y Pardo, I. 2000.** Malolactic fermentation in wine with high densities of non-proliferating *Oenococcus oeni*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **16**, 805-810
- Manz, W., Szewzyk, U., Ericsson, P., Amann, R., Schleifer, K. H. y Stenstrom, T. A. 1993.** *In situ* identification of bacteria in drinking water and adjoining biofilms by hybridization with 16S and 23S rRNA-directed fluorescent oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**, 2293-8

- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M. y Schleifer, K. H. 1996.** Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides in the natural environment. *Microbiology-Uk*. **142**, 1097-1106
- Mañes-Lázaro, R., Ferrer, S., Rodas A. M., Urdiain, M. y Pardo, I. 2008a.** *Lactobacillus bobalius* sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from Spanish Bobal grape must. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **58**: 2699-2703.
- Mañes-Lázaro, R., Ferrer, S., Rosselló-Mora, R. y Pardo, I. 2008b.** *Lactobacillus uvarum* sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from Spanish Bobal grape must". *Systematic and Applied Microbiology*. 31: 425-433. 2008.
- Mariette, I., Schwarz, E., Vogel, R. F. y Hammes, W. P. 1991.** Characterization by plasmid profile analysis of acetic acid bacteria from wine, spirit and cider acetators for industrial vinegar production. *Journal of Applied Bacteriology*. **71**, 134-138
- Martinez, J., Millán, C. y Ortega, J. M. 1989.** Growth of natural flora during the fermentation of inoculated musts from "Pedro Ximénez" grapes. *South African Journal of Enology and Viticulture*. **10**, 31-35
- Matte-Tailliez, O.; Quénéec, P. ;Çibik, R.; van Opstal, J.; Dessevre, F.; Firmesse, O. y Tailliez, P. 2001.** Detection and identification of lactic acid bacteria in milk and industrial starter culture with fluorescently labeled rRNA-targeted peptide nucleic acid probes. *Lait* **81**, 237-248
- Millet, V. y Lonvaud-Funel, A. 2000.** The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology*. **30**, 136-141
- Millière, J. B., Mathot, A. G., Schmitt, P. y Divies, C. 1989.** Phenotypic characterization of *Leuconostoc* species. *Journal of applied bacteriology*. **67**, 529-542.
- Moonmangmee, D., Agachi, D., Ano, Y., Shinagawa, E., Toyama, H, Theragool., G., Loton, N., y Matsushita, K. 2000.** Isolation and characterization of thermotolerant *Gluconobacter* strains catalyzing oxidative fermentation at higher temperatures. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **64**:2306-2315
- Mora, D., Fortina, M. G., Parini, C. y Manachini, P. L. 1997.** Identification of *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* based on 16S rRNA and *ldhD* gene-targeted multiplex PCR analysis. *FEMS Microbiology Letters*. **151**, 231-236
- Mora, D., Fortina, M. G., Parini, C., Daffonchio, D. y Manachi, P. L. 2000.** Genomic subpopulations within the species *Pediococcus acidilactici* detected by multilocus typing

analysis: relationships between pediocin AcH/PA-1 producing and non-producing strains. *Microbiology*. **146**, 2027-2038

Mori, K., Yamazaki, K., Ishiyama, T., Katsumata, M., Kobayashi, K., Kawai, Y., Inoue, N. y Shinano, H. 1997. Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **47**, 54-57

Muñoz, R., Moreno-Arribas, R. y De Las Rivas, B. 2005. Bacterias lácticas. En *Microbiología del vino*. Carrascosa, V., Muñoz, R. y Gonzalez, R. AMV Ediciones. Madrid. 231-272

Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Seshadri, S. y Lakshminarasimhan, C. 2002. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science*. **83**, 137-145

Navarro, E., Simonet, P., Normand, P. y Bardin, R. 1992. Characterisation of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. *Archives of Microbiology*. **157**, 107-115

Navarro, R. R. y Komagata, K. 1999. Differentiation of *Gluconacetobacter liquefaciens* and *Gluconacetobacter xylinus* on the basis of DNA base composition, DNA relatedness, and oxidation products from glucose. *Journal of General and Applied Microbiology*. **45**, 7-15

Nissen, H., Holck, A. y Dainty, R. H. 1994. Identification of *Carnobacterium* spp. and *Leuconostoc* spp. in meat by genus-specific 16S rRNA probes. *Letters in Applied Microbiology*. **19**, 165-8

Olsen, K. N.; Brockmann, E. y Molin, S. 2007. Quantification of *Leuconostoc* populations in mixed dairy starter cultures using fluorescence in situ hybridization. *Journal of Applied Microbiology*. **103**, 855-863

Olsen G.J., yWoese C.R. 1993 Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *Federation of American Societies for Experimental Biology* **J7**:113–123

Oliveira, M., Blasco, L., Ferrer, S. y Bernardo, F. 2002. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* by Fluorescent In Situ Hybridization. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinária*, **99**, 215-218

Okafor, N. 1975. Microbiology of Nigerian palm wine with particular reference to bacteria. *Journal of applied bacteriology*. **38**, 81-88

Orla-Jensen, S. The Lactic Acid Bacteria. **1919**. Host, Copenhagen.

- Ough, C. S. y Amerine, M. A. 1976.** Ethyl carbamate in fermented beverages and foods I. Naturally occurring ethyl carbamate. *Journal of agricultural and food chemistry*. **24**, 323-328
- Ough, C. S. y Amerine, M. A. 1988.** en *Methods for analysis of must and wines*, 2nd edition. New York: John Wiley. 133-134
- Pan, C. S., Lee, T. H. y Fleet, G. H. 1982.** A comparison of five media for the isolation of lactic acid bacteria from wines. *Australian Grape Grow. Winemaker*. **220**, 42-46
- Pardo, I., Garcia, M. J., Zuñiga, M. y Uruburu, F. 1988.** Evaluation of the API 50 CHL system for identification of *Leuconostoc oenos*. *American Journal of Enology and Viticulture*. **39**, 347-350
- Pardo, I. y Zúñiga, M. 1992.** Lactic acid bacteria in Spanish red rosé and white musts and wines under cellar conditions. *Journal of Food Science*. **57**, 392-405
- Pardo, I., Rodas, A. M. y Ferrer, S. 1998.** Study on population dynamics of *Oenococcus oeni* in wine by using RFLP-PFGE. *Les entretiens scientifiques Lallemand. The management of malolactic fermentation and quality of wine*. **6**, 93-96
- Pardo, I. 2003.** Metabolismo de sustratos del mosto y vino por bacterias lácticas y sus implicaciones en la calidad del vino. *Ace: Revista de Enología*. **36**
- Patarata, L., Serpa-Pimentel, M., Pot, B., Kersters, K. y Mendes, F. A. 1994.** Identification of lactic acid bacteria isolated from Portuguese wines and must by SDS-PAGE. *Journal of applied bacteriology*. **76**, 288-293
- Poblet, M., Rozès, N., Guillamón, J. M. y Mas, A. 2000a.** Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *Letters in Applied Microbiology*. **31**, 63-67
- Poblet, M., Rozès, N., Ruiz, A., Reguant, C., Beltrán, G., Torija, M. A. J., Guillamón, J. M., Bordons, A. y Mas, A. 2000b.** Seguimiento e identificación de los microorganismos presentes durante la elaboración de los vinos. *Alimentación, equipos y tecnología*. **19**, 95-100
- Prévost, H., Cavin, J. F., Lamoureux, M. y Diviès, C. 1995.** Plasmid and chromosome characterization of *Leuconostoc oenos* strains. *American Journal of Enology and Viticulture*. **46**, 43-48
- Querol, A. y Barrio, E. 1990.** A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic acid research*. **18**, 1657
- Querol, A., Jiménez, M. y T., H. 1990.** Microbiological and enological parameters during fermentation of musts from poor and normal grape-harvests in the region of Alicante (Spain). *Journal of Food Science*,. **55**, 1603-1606

Rademaker J.L.W. y De Bruijn F.J. 2005. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. The Rep-PCR Genomic Fingerprinting Home Page. <http://www.msu.edu/user/debruijn/>

Radler, F. y Yannisis, C. 1972. Weinsäureabbau bei Milchhsäurebakterien. *Archives of Microbiology*. **82**, 219-238

Reguant, C. y Bordons, A. 2003. Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *Journal of Applied Microbiology*. **95**, 344-353

Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P., Sudraud, P. y Anati, A. 1980. Trattato di scienza e tecnica enologica, 3, AEB, Brescia. **1980**.

Ribéreau-Gayon, P. 1985. New developments in wine microbiology. *American Journal of Enology and Viticulture*. **36**,

Ribéreau-Gayon, P., Dubordieu, D., Donèche, B. y Lonvaud, A. 2000. Handbook of Enology Vol 1. The microbiology of wine and vinifications. John Wiley ad Sons Ltd. . Chichester, England.

Rodas, A. M., Ferrer, S. y Pardo, I. 2003. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Systematic and Applied Microbiology*. **26**, 412-422

Rodas, A. M., Ferrer, S. y Pardo, I. 2005. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **55**, 197-207

Rodas, A. M., Chenoll, E., Macián, M. C., Ferrer, S., Pardo, I. y Aznar, R. 2006. *Lactobacillus vini* sp. nov., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **56**, 513-517

Rosini, G., Federichi, F. y Martini, A. 1982. Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbiological Ecology*. **8**, 83-89

Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A. y Guillamón, J. M. 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **50**, 1981-1987

Sapis-Domercq, S., Bertrand, A., Mur, F. y Sarre, C. 1977. Influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore levurienne. Experimentation 1976. *Connaissance de la Vigne et du Vin*. **11**, 227-242

Sato, H., Yanagida, F., Shinohara, T., Suzuki, M., Suzuki, K.-I. y Yokotsuka, K. 2001. Intraspecific diversity of *Oenococcus oeni* isolated during red wine-making in Japan. *FEMS Microbiology Letters*. **202**, 109-114

Savelkoul, P. H. M., Aarts, H. J. M., Haas, J. D., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J. L. W., Schouls, L. y Lenstra, J. A. 1999. Amplified-Fragment Length Polymorphism analysis: the State of an Art. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**, 3083-3091

Schillinger, U., Holzapfel, W. y Kandler, O. 1989. Nucleic Acid Hybridization Studies on *Leuconostoc* and Heterofermentative Lactobacilli and Description of *Leuconostoc amelibiosum* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*. **12**, 48-55.

Schleifer, K. H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W. y Amann, R. 1995. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International-Dairy-Journal*. **5**, 1081-1094

Schmitt, P., Mathot, A. G. y Divies, C. 1989. Fatty acid composition of the genus *Leuconostoc*. *Milchwissenschaft*. **44**, 556-559

Schuller, G., Hertel, C. y Hammes, W. P. 2000. *Gluconacetobacter entanii* sp nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **50**, 2013-2020

Sefridge, T. B. y Amerine, M. A. 1980. Odor thresholds and interactions of ethyl acetate and diacetyl in an artificial wine medium. *American Journal of Enology and Viticulture*. **29**, 1-3

Sieiro, C., Cansado, J., Agrelo, D., Velazquez, J. B. y Villa, T. G. 1990. Isolation and enological characterization of malolactic bacteria from the vineyards of northwestern Spain. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**, 2936-2938

Sievers, M., Ludwig, W. y Teuber, M. 1994a. Phylogenetic positioning of *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodopila* and *Acidiphilium* species as a branch of acidophilic bacteria in the alpha-subclass of *Proteobacteria* based on 16S ribosomal DNA sequences. *Systematic and Applied Microbiology*. **17**, 189-196

Sievers, M., Sellmer, S. y Teuber, M. 1994b. *Acetobacter europaeus* sp. nov., a main component of industrial vinegar fermenters in central Europe. *Systematic and Applied Microbiology*. **15**, 386-392

Sievers, M. y Teuber, M. 1995. The microbiology and taxonomy of *Acetobacter europaeus* in commercial vinegar production. *Journal of Applied Bacteriology*. **79**, S84-S95

- Sievers, M., Lorenzo, A., Gianotti, S., Boesch, C. y Teuber, M. 1996.** 16-23S ribosomal RNA spacer regions of *Acetobacter europaeus* and *A. xylinum*, tRNA genes and antitermination sequences. *FEMS Microbiology Letters*. **142**, 43-48
- Silva, L. R., Cleenwerck, I., Rivas, R., Swings, J., Trujillo, M. E., Willems, A. y Velázquez, E. 2006.** *Acetobacter oeni* sp. nov., isolated from spoiled red wine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **56**, 21-24.
- Silva, M. L., Macedo, A. C. y Malcata, F. X. 2000.** Review: Steam distilled spirits from fermented grape pomace. *Food and science Technology international*. **6**, 285-300
- Sokollek, S. J., Hertel, C. y Hammes, W. P. 1998.** Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **48**, 935-940
- Sohier, D. y Lonvaud-Funel, A. 1998.** Rapid and sensitive *in situ* hybridization method for detecting and identifying lactic acid bacteria in wine. *Food Microbiology*. **15**, 391-397
- Sohier, D., Coulon, J. y Lonvaud, F.-A. 1999.** Molecular identification of *Lactobacillus hilgardii* and genetic relatedness with *Lactobacillus brevis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **49**, 1075-1081
- Soufleros, E. y Bertrand, A. 1979.** Rôle de la souche de levure dans la production de substances volatiles au cours de la fermentation du jus de raisin. *Vigne Vin*. **13**, 181-185
- Splittoesser, D. F. y Churney, J. J. 1992.** The incidence of sorbic acid-resistant Gluconobacters and yeasts on grapes grown in New York State. *American Journal of Enology and Viticulture*. **43**, 290-293
- Sponholz, W. R.** Wine Spoilage by microorganisms In: Wine Microbiology and Biotechnology. **1993**. en (Ed.), G. H. F. Hardwood Academic Publishers. Switzerland. 395-421
- Stiles, M. E. y Holzappel, W. H. 1997.** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International-Journal-of-Food-Microbiology*. **36**, 1-29
- Suarez, J. A. y Iñigo, B.** Microbiología enológica. **1990**. Ediciones Mundi Prensa, Madrid.
- Swings, J., Gillis, M., Kersters, K., De Vos, P., Gossele, F. y De Ley, J. 1980.** *Frateuria*, a new genus for "*Acetobacter aurantius*". *International Journal of Systematic Bacteriology*. **30**, 547-556
- Swings, J. y De Ley, J.** The Genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*. In: The Prokaryotes, a Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. **1981**. en Starr, M. P., Stolp, H., Truper, B., Balows, B. y Schlegel, H. G. Springer Verlag. Berlin. 771-778

Swings, J., Gillis, M. y Kersters, K. Phenotypic identification of acetic acid bacteria. 1992. en *Identification Methods in Applied and Environmental Microbiology*. Board, R., Jones, D. y Skinner, F. A. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 103-111

Tanasupawat S., Pakdeeto A., Thawai C., Yukphan P. y Okada S. 2007. Identification of lactic acid bacteria from fermented tea leaves (miang) in Thailand and proposals of *Lactobacillus thailandensis* sp. nov., *Lactobacillus camelliae* sp. nov., and *Pediococcus siamensis* sp. nov. *The Journal of General and Applied Microbiology*. **53**, 7-15.

Tracey, R. P. y Britz, T. J. 1987. A numerical taxonomic study of *Leuconostoc oenos* strains from wine. *Journal of Applied Bacteriology*. **63**, 523-532

Tracey, R. P. y Britz, T. J. 1989. Freon 11 extraction of volatile metabolites formed by certain lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**: 1617-1623.

Trčák, J., Ramus, J. y Raspor, P. 1997. Phenotypic characterization and RAPD-PCR profiling of *Acetobacter* sp. isolated from spirit vinegar production. *Food Technological Biotechnology*. **35**, 63-67

Trčák, J. y Raspor, P. 1999. Molecular characterization of acetic acid bacteria isolated from spirit vinegar. *Food Technology and Biotechnology*. **37**, 113-116

Trčák, J., Raspor, P. y Teuber, M. 2000. Molecular identification of *Acetobacter* isolates from submerged vinegar production, sequence analysis of plasmid pJK2-1 and application in the development cloning vector. *Applied and Environmental Microbiology*. **53**, 289-295

Trčák, J. y Teuber, M. 2002. Genetic and restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. **208**, 69-75

Trčák, J. 2005. Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ dependent alcohol dehydrogenase gene. *Systematic and Applied Microbiology*. **28**, 735-745

Tuschak, C., Glaeser, J. y Overmann, J. 1999. Specific detection of green sulphur bacteria by *in situ* hybridization with a fluorescently labeled oligonucleotide probe. *Archives of Microbiology*. **171**, 265-272

Urakami, T., Tamaoka, J., Suzuki, K.-I. y Komagata, K. 1989. *Acidomonas* ge. nov., incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas methanolica* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **39**, 50-55

Van Vuuren, H. J. J. y Dicks, L. M. T. 1993. *Leuconostoc oenos*: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*. **44**:, 99-112

Vaughn, R. H. 1955. Bacterial spoilage of wines with special reference to California conditions. *Advances in Food Research*. **6**, 67-108

Vidal-Carou, M. C., Ambattle-Espunyes, A., Ulla-Ulla, M. C. y Mariné-Font, A. 1990a. Histamine and tyramine in Spanish wines: Their formation during the winemaking process. *American Journal of Enology and Viticulture*. **41**,

Vidal-Carou, M. C., Codony Salcedo, R. y Marine Font, A. 1990b. Histamine and tyramine in Spanish wines: relationships with total sulfur dioxide level, volatile acidity and malo-lactic fermentation intensity. *Food Chemistry*. **35**, 217-227

Viti, C., Giovannetti, L., Granchi, L. y Ventura, S. 1996. Species attribution and strain typing of *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) with restriction endonuclease fingerprints. *Research Microbiology*. **147**, 651-660

Wagner, M. y Amann, R. 4. Molecular techniques for determining microbial community structures in activated sludge. **1994.** en 61-72

Wallner, G., Amann, R. y Beisker, W. 1993. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganism. *Cytometry*. **14**, 136-143

Watanabe, M. y Lino, S. Studies on bacteria isolated from Japanese wines. **1984.** Shokuhin.

Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C., Fleet, G. H. y Lee, T. H. 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine - A review. *American Journal of Enology and Viticulture*. **36**, 302-313

Wilker, K. L. y Dharmadhikari, M. R. 1997. Treatment of barrel wood infected with acetic acid bacteria. *American Journal of Enology and Viticulture*. **48**, 516-520

Wood B. J. B. y Holzapfel, W. H. 1998. Lactic acid bacteria in contemporary perspective. In "The genera of lactic acid bacteria" Vol 2 . Wood B. J. B. y Holzapfel, W. H. (Eds). Blackie Academic and Professional. London.

Yamada, Y., Itakura, N., Yamashita, M., Tahara, T., Yamasato, K. y Kaneko, T. 1981a. Deoxyribonucleic acid base composition and deoxyribonucleic acid homology in acetic acid bacteria, especially in the polarly flagellated intermediate strains. *Journal of General and Applied Microbiology*. **27**, 465-475

Yamada, Y., Nunoda, M., Ishikawa, T. y Tahara, T. 1981b. The cellular fatty acid composition in acetic acid bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology*. **27**, 405-417

Yamada, Y., Itakura, N., Yamashita, M. y Tahara, T. 1984. Deoxyribonucleic acid homologies in strains of *Gluconobacter* species. *Journal of fermented technology*. **62**, 595-600

Yamada, Y. y Kondo, K. 1984. *Gluconacetobacter*, a new subgenus comprising the acetate-oxidizing acetic acid bacteria with ubiquinone-10 in the genus *Acetobacter*. *Journal of General and Applied Microbiology*. **30**, 297-303

Yamada, Y., Hoshino, K. y Ishikawa, T. 1997. Taxonomic studies of acetic acid bacteria and allied organisms .11. the phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16s ribosomal RNA - the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. **61**, 1244-1251

Yamada, Y., Hosono, R., Lisdyanti, P., Widyastuti, Y., Saono, S., Uchimura, T. y Komagata, K. 1999. Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*. *Journal of General and Applied Microbiology*. **45**, 23-28

Yamada, Y. 2000. Transfer of *Acetobacter oboediens* Sokollek *et al.* 1998 and *Acetobacter intermedius* Boesch *et al.* 1998 to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **50**, 2225-2227

Yukphan, P., Malimas, T., Takahashi, M., Potacharoen, W., Busabun, T., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. 2004a. Re-identification of *Gluconobacter* strains based on restriction analysis of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions. *Journal of General and Applied Microbiology*. **50**, 189-195

Yukphan, P., Potacharoen, W., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. y Yamada, Y. 2004b. Identification of strains assigned to the genus *Gluconobacter asai* 1935 based on the sequence and the restriction analyses of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions. *Journal of General and Applied Microbiology*. **50**, 9-15

Zapparoli, G., Torriani, S., Pesente, P. y Dellaglio, F. 1998. Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Letters in Applied Microbiology and Biotechnology*. **27**, 243-246

Zapparoli, G., Reguant, C., Bordons, A., Torriani, S. y Dellaglio, F. 2000. Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Current Microbiology*. **40**, 351-355

8. Anexo

Anexo I

Medios de cultivo para BL

La concentración de los componentes de los medios de cultivo está expresada para un litro de volumen final. Ambos medios fueron utilizados tanto para el crecimiento rutinario de bacterias como para su aislamiento (en este caso el medio fue suplementado con 1 mg mL^{-1} de natamicina, a fin de evitar el desarrollo de levaduras también presentes en las muestras).

MRS (descrito por De Man *et al.*, 1960) adicionando 0.5 g L^{-1} de L-cisteína HCl (MRSm) para lactobacilos, pediococos y leuconostocs.

MLO (Caspritz y Radler, 1983)

MLO pH 4'8	
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Glucosa	10 g
Fructosa	5 g
Citrato diamónico	2'5 g
Tween 80	1 mL
Cisteina clorhidrato	0'5 g
Solución de sales*	10 mL
Zumo de tomate	300 mL
Agua	hasta 1 L

*: Preparación de 5 g L^{-1} de MnSO_4 más 20 g L^{-1} de MgSO_4

Esta receta es para medio líquido En la preparación de medio sólido se recomienda esterilizar por separado el agar (concentración final en placa 20 g L^{-1}) en 500 mL de agua en una botella de 1 L con pececillo y el resto de componentes en el volumen de líquido restante, a fin de evitar la hidrólisis del agar debida al bajo pH.

Medios de cultivo para BA

Manitol Agar (MA)	
Extracto de levadura	5 g
Peptona	3 g
Manitol	25 g
Agar	15 g
Agua destilada	hasta 1 L

Medio de carbonato cálcico (GYA)	
Glucosa	10 g
Extracto de levadura	10 g
CaCO ₃	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	hasta 1 L

RAE	
Glucosa	40 g
Peptona	10 g
Extracto de levadura	10 g
Ácido cítrico · H ₂ O	1.5 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	3.38 g
Ácido acético glacial	10 mL
Etanol absoluto	10 mL
Agua destilada	hasta 1 L

pH final 3.8 (no hace falta ajustarlo)

En relación al medio RAE, ambos medios líquido y sólido fueron preparados autoclavando todos los componentes sin la adición del ácido acético glacial y el etanol. El ácido acético y el etanol fueron esterilizados previamente mediante filtración usando filtros de teflón de 0.22 µm de tamaño de poro.

En la preparación de medio sólido se empleó el sistema de doble capa, la capa inferior contenía una concentración de agar al 0.5% mientras que la capa superior contenía el 1%.

<i>Acetobacter europaeus</i> Medium (G. europ Medio)	
Glucosa	5 g
Peptona	3 g
Extracto de levadura	2 g
Ácido acético	40 mL
Etanol absoluto	30 mL
Agua destilada	hasta 1 L

El medio se prepara del mismo modo que el anteriormente descrito RAE.

