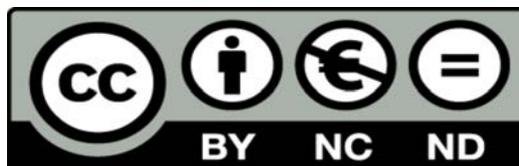




UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
La detección de bacterias acéticas en vinos: problemática y desarrollo de un test rápido de predicción
Autor/es
Alejandro Parra Manzanares
Director/es
Ana Rosa Gutiérrez Viguera y Isabel López Alfaro
Facultad
Facultad de Ciencia y Tecnología
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico
2023-2024



La detección de bacterias acéticas en vinos: problemática y desarrollo de un test rápido de predicción, tesis doctoral de Alejandro Parra Manzanares, dirigida por Ana Rosa Gutiérrez Viguera y Isabel López Alfaro (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

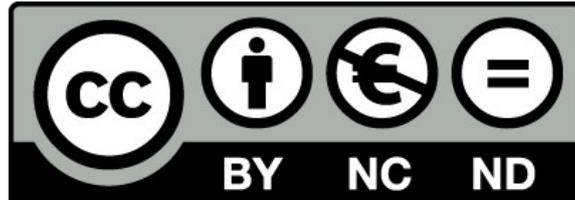


UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

2023

Título
LA DETECCIÓN DE BACTERIAS ACÉTICAS EN VINOS: PROBLEMÁTICA Y DESARROLLO DE UN TEST RÁPIDO DE PREDICCIÓN
Autor
Alejandro Parra Manzanares
Directoras
Ana Rosa Gutiérrez Viguera Isabel López Alfaro
Facultad
Facultad de Ciencia y Tecnología
Departamento
Agricultura y Alimentación
Programa de doctorado
Doctorado en Enología, Viticultura y Sostenibilidad
Curso Académico
2022 - 2023



La detección de bacterias acéticas en vinos: problemática y desarrollo de un test rápido de predicción, tesis doctoral de Alejandro Parra manzanares, dirigida por Ana Rosa Gutiérrez Viguera e Isabel López Alfaro (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor

© Universidad de La Rioja, Servicio de publicaciones, 2023

Publicaciones.unirioja.es

**LA DETECCIÓN DE BACTERIAS ACÉTICAS EN VINOS:
PROBLEMÁTICA Y DESARROLLO DE UN TEST RÁPIDO
DE PREDICCIÓN**

**DETECTION OF ACETIC BACTERIA IN WINES:
PROBLEMS AND DEVELOPMENT OF A RAPID
PREDICTION TEST**

Alejandro Parra Manzanares

Tesis Doctoral

Logroño 2023



Departamento de Agricultura y Alimentación

Área de Tecnología de los Alimentos

TESIS DOCTORAL

LA DETECCIÓN DE BACTERIAS ACÉTICAS EN VINOS: PROBLEMÁTICA Y
DESARROLLO DE UN TEST RÁPIDO DE PREDICCIÓN

Memoria presentada por ALEJANDRO PARRA MANZANARES para optar al título de
Doctor por la Universidad de La Rioja.

Logroño 2023



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

Departamento de Agricultura y Alimentación

Área de Tecnología de los Alimentos

Las doctoras ANA ROSA GUTIÉRREZ VIGUERA, catedrática de Universidad, e ISABEL LÓPEZ ALFARO, Profesora Titular de Universidad, ambas del Departamento de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja

HACEN CONSTAR

Que el presente trabajo titulado **“La detección de bacteria acéticas en vinos: problemática y desarrollo de un test rápido de predicción”**, que presenta D. Alejandro Parra Manzanares para optar al grado de Doctor por la Universidad de La Rioja, ha sido realizado bajo nuestra supervisión en Laboratorios Dolmar Tentamus, y que los resultados obtenidos son fruto de experimentos llevados a cabo por el doctorando.

Para que conste y tenga los efectos oportunos, firmamos el presente certificado.

Logroño, octubre de 2023

Dra. Ana Rosa Gutiérrez Viguera

Dra. Isabel López Alfaro

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mis directoras de tesis, Ana Rosa e Isabel, su ayuda en estos años.

Muy importante ha sido el apoyo en estos años de mis compañeros de Laboratorios Dolmar, tanto desde la dirección, Ana, Mariano, Pablo, como del resto del laboratorio, en especial de Aroa y de Pachi.

Finalmente, la paciencia de María Pilar, Rafa y Sara, que en casa han aguantado cuando estaba redactando o leyendo bibliografía sin poder dedicarles más tiempo, al igual que a mis padres.

i. LISTA DE TABLAS:

Tabla 1 - Evolución de la cantidad de bacterias acéticas durante las diferentes fases del proceso de elaboración del vino.

Tabla 2 - Especies de bacterias acéticas.

Tabla 3 - Medio PCA para recuento de microorganismos aerobios.

Tabla 4 - Medio GYC para recuento de Acetobacterias.

Tabla 5 - Medio G2 para recuento de Acetobacterias.

Tabla 6 - Medio Kneifel para recuento de Acetobacterias.

Tabla 7 - Medio Wallerstein.

Tabla 8 - Medio A de cultivo líquido para semicuantificación de bacterias acéticas.

Tabla 9 - Medio B de cultivo líquido para semicuantificación de bacterias acéticas.

Tabla 10 - Medio C de cultivo líquido para semicuantificación de bacterias acéticas.

Tabla 11 - Medio D de cultivo líquido para semicuantificación de bacterias acéticas.

Tabla 12 - Medio de cultivo líquido Final para semicuantificación de bacterias acéticas.

Tabla 13 - Cepas de microorganismos utilizados y referencias.

Tabla 14 - Población de bacterias acéticas en 25 vinos, analizados por PCR y presencia/ausencia de crecimiento en los medios de cultivo estudiados.

Tabla 15 - Resultados de los análisis físico-químicos del vino Tempranillo (2017) con alto contenido en ácido acético.

Tabla 16 - Resultados de los análisis del vino Tempranillo (2017) mediante q-PCR y medios de cultivo sólidos existentes previamente.

Tabla 17 - Resultados del análisis de un vino con bacterias acéticas en concentración 10^5 cel/ml en los medios A y B a lo largo del tiempo.

Tabla 18 - Composición físico-química de los 25 vinos estudiados.

Tabla 19 - Población de distintas especies (cel/ml) obtenida mediante qPCR de los 25 vinos del estudio.

Tabla 20 - Resultados del análisis de 25 vinos en los medios A y B.

Tabla 21 - Resultados de la siembra en los medios B, C, C+R, D y D+R de un vino con bacterias acéticas (10⁵ cel/ml).

Tabla 22 - Desarrollo en los medios B, C, C+R, D y D+R de diferentes microorganismos (cel/ml) procedentes de un vino con bacterias acéticas al cabo de una semana de incubación.

Tabla 23 - Análisis físico-químico de los 10 vinos estudiados.

Tabla 24 - Análisis mediante q-PCR (cel/ml) del vino inicial (VINO), y de los botes con los medios de cultivo B y D+R al cabo de dos semanas.

Tabla 25 - Evolución de la concentración de ácido acético y su detección por olfacción en 10 vinos sembrados en los medios B y D+R.

Tabla 26 - Estudio de caducidad del medio de cultivo.

Tabla 27 - Medio Final de cultivo líquido para bacterias acéticas.

Tabla 28 - Población media de bacterias acéticas y niveles de ácido acético iniciales en los vinos empleados para el estudio de cuantificación.

Tabla 29 - Valores medios de la evolución de la concentración de ácido acético de las diluciones realizadas con las muestras sembradas en el medio de cultivo a lo largo del tiempo.

Tabla 30 - Resultados del análisis de ácido acético (g/l) y la población de *A. aceti* del medio de cultivo con el paso del tiempo en el medio de cultivo y en el medio adicionado con vino estéril.

Tabla 31 - Evolución de la concentración (g/l) de ácido acético en muestras inoculadas con diferentes bacterias acéticas a diferentes concentraciones.

Tabla 32 - Evolución del ácido acético (g/l) en el medio de cultivo inoculado con diferentes microorganismos directamente en el medio (MEDIO) o en vino estéril (VINO).

Tabla 33 - Evolución del ácido acético (g/l) en el medio inoculado con *Acetobacter aceti* y diferentes microorganismos directamente en el medio (MEDIO) o en vino estéril (VINO).

Tabla 34 - Resultados de la evolución de g/l de ácido acético con el paso de tiempo en muestras contaminadas con diferentes microorganismos en conjunto con *Gluconobacter oxidans*.

Tabla 35 - Resultados de la evolución de g/l de ácido acético con el paso de tiempo en muestras contaminadas con diferentes microorganismos en conjunto con *Komagataeibacter europaeus*.

Tabla 36 - Resultados de la evolución de g/l de ácido acético con el paso de tiempo en muestras provenientes de intercomparativo.

Tabla 37 - Análisis físico-químico de los vinos estudiados.

Tabla 38 - Población de microorganismos detectados mediante qPCR (cel/ml) de las 4 muestras de mosto y las 45 de vinos comerciales.

Tabla 39 - Evolución de la concentración de acético y de la detección por olfacción de 4 muestras de mosto y 45 de vinos comerciales.

Tabla 40 - Tabla para la interpretación de los resultados.

Tabla 41 - Resultados obtenidos por la bodega 1 con el medio de cultivo.

Tabla 42 - Resultados obtenidos por la bodega 2 con el medio de cultivo.

Tabla 43 - Resultados obtenidos por la bodega 3 con el medio de cultivo.

Tabla 44 - Resultados obtenidos por la bodega 4 con el medio de cultivo.

Tabla 45 - Resultados obtenidos por la bodega 5 con el medio de cultivo.

Tabla 46 - Resultados obtenidos por la bodega 6 con el medio de cultivo.

Tabla 47 - Resultados obtenidos por la bodega 7 con el medio de cultivo.

ii. LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de elaboración de vino

Figura 2 - Ciclo del metabolismo del etanol

Figura 3 - Ciclo del metabolismo de los azúcares

Figura 4 - Medios de cultivo sólido (GYC, G2, Kneiffel y Wallerstein).

Figura 5 - Cantidades en ml que se inoculan en una placa de Petri o en un medio de cultivo líquido.

Figura 6 - Análisis visuales, olfativos y de acético para evaluar el medio líquido diseñado.

Figura 7 – Porcentajes de representación de especies bacterianas.

Figura 8 - Evolución en las diferentes muestras de la concentración de ácido acético a una población inicial de bacterias acéticas de 10^3 cel/ml.

Figura 9 - Evolución de la concentración de ácido acético en un medio inoculado directamente con bacterias en una población 10^3 UFC/ml.

Figura 10 - Evolución de la concentración de ácido acético en un medio inoculado directamente con bacterias en una población 10^7 UFC/ml.

Figura 11 - Protocolo para el uso del medio de cultivo.

Figura 12 - Ficha a rellenar durante el ensayo realizado por las bodegas.

ÍNDICE



Índice

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. La elaboración del vino.....	7
1.2. Importancia de la industria del vino en España.....	8
1.3. Microorganismos que participan en las vinificaciones.....	9
1.3.1. Las levaduras y la fermentación alcohólica.....	9
1.3.2. Las bacterias lácticas y la fermentación maloláctica.....	10
1.4. Microorganismos alterantes de los vinos.....	12
1.5. Las bacterias acéticas en vinificación.....	13
1.5.1. Características generales.....	13
1.5.2. Clasificación.....	14
1.5.3. Metabolismo.....	14
1.5.3.1. Metabolismo del etanol.....	14
1.5.3.2. Metabolismo de otros alcoholes.....	15
1.5.3.3. Metabolismo de los azúcares.....	16
1.5.3.4. Metabolismo de los ácidos orgánicos.....	16
1.5.3.5. Metabolismo del nitrógeno.....	17
1.5.4. Efectos en el vino.....	17
1.5.5. Control de las bacterias acéticas en la vinificación.....	17
1.5.6. Medidas curativas.....	21
1.6. Otros microorganismos productores de ácido acético.....	22
1.7. Aislamiento e identificación de las bacterias acéticas.....	22
1.7.1. Medios de cultivo tradicionales.....	22
1.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	23
1.7.3. Citometría de flujo.....	24
1.7.4. MALDI-TOF.....	24
1.7.5. Secuenciación.....	25
1.7.6. Secuenciación masiva.....	25
2. JUSTIFICACIÓN.....	27
3. OBJETIVO.....	33
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
4.1. Ensayos.....	37

4.1.1. Secuenciación masiva de vinos contaminados.....	37
4.1.2. Análisis de la eficacia de los medios de cultivo disponibles en la detección de Bacterias Acéticas (BA).....	37
4.1.3. Diseño de un nuevo medio de cultivo	38
4.1.4. Estudio de mejoras del medio de cultivo líquido	40
4.1.5. Estudio de la caducidad y estabilidad del medio de cultivo	41
4.1.6. Estudios de sensibilidad del medio de cultivo.....	41
4.1.7. Estudios de especificidad y capacidad de cuantificación del medio	41
4.1.8. Pruebas de validación del medio. Interferencias de otros microorganismos	42
4.1.8.1 Pruebas con microorganismos cultivados en medio de cultivo líquido.....	42
4.1.8.2 Pruebas con microorganismos procedentes de vinos contaminados	42
4.1.9. Estudios con diferentes vinos y mostos comerciales	43
4.1.10. Estudios en diferentes bodegas.....	43
4.2. Muestras de vinos utilizados en los distintos ensayos realizados	43
4.3. Análisis físico-químico de los vinos.....	44
4.4. Análisis microbiológicos.....	45
4.4.1. Medios de cultivo empleados.....	45
4.4.2. Cepas de microorganismos utilizadas.....	45
4.4.3. qPCR (PCR cuantitativa en tiempo real)	51
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
5.1. Secuenciación masiva de vinos alterados.....	55
5.2. Análisis de la eficacia de los medios de cultivo en la detección de bacterias acéticas.....	58
5.3. Diseño de un nuevo medio de cultivo	59
5.4. Estudio de mejoras del medio de cultivo líquido	70
5.5. Estudio de la caducidad y estabilidad del medio de cultivo	75
5.6. Estudios para la cuantificación de bacterias acéticas.....	77
5.7. Estudios de la respuesta del medio para diferentes especies de bacterias acéticas	81
5.8. Interferencia de otros microorganismos (levaduras y bacterias lácticas)	85
5.9. Estudios con diferentes vinos y mostos.....	91
5.10. Protocolo de uso e interpretación de resultados del medio de cultivo diseñado.....	97
5.11. Estudios en diferentes bodegas del medio de cultivo	101
6. CONCLUSIONES	109
7. BIBLIOGRAFÍA.....	113

RESUMEN



RESUMEN

Los microorganismos implicados en los procesos de elaboración del vino son muy diversos y determinan la calidad del vino final. No solo participan en el desarrollo de la fermentación alcohólica y maloláctica sino que hay numerosos microorganismos implicados en la aparición de defectos en los vinos, como el picado acético causado por bacterias acéticas. La detección de estos microorganismos con los medios de cultivo disponibles no es adecuada, sobre todo cuando se encuentran en poblaciones bajas. Por otra parte, las técnicas de biología molecular disponibles como la secuenciación masiva o la qPCR no se pueden utilizar de forma generalizada en las bodegas.

Esta tesis doctoral plantea el desarrollo de un medio de cultivo líquido que permita la detección precoz de microorganismos causantes del “picado acético” mediante olfatometría. Partiendo de estudios realizados con medios de cultivo sólidos, se ha desarrollado un medio de cultivo líquido con gran sensibilidad para detectar bacterias acéticas. Este medio ha sido validado con diferentes tipos de vinos y mostos y se han optimizado sus condiciones de conservación. Finalmente, el empleo del medio en bodegas comerciales, por personal que trabaja de forma habitual en los laboratorios de las bodegas, ha permitido verificar la sencillez de su uso y su eficacia.

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1.1. La elaboración del vino

Desde hace unos 10000 años el hombre elabora vino, en el Neolítico en Oriente Medio ya se cultivaba la vid. Los pasos básicos en la elaboración del vino no han variado con el paso del tiempo, pero sí han evolucionado principalmente desde principios del siglo XX con los avances en química y también en otras disciplinas como ingeniería y microbiología aplicados a la enología.

La elaboración del vino^{1,2} comienza con el cuidado de las uvas en el viñedo, porque cada vez se le da más importancia al terreno en el que se plantan las viñas, la variedad de uvas, la climatología, el tipo de vino que se quiere elaborar, etc.

La calidad y el tipo de vino depende además de otros factores, como son el momento de la vendimia, el grado madurez de la uva, el tipo de vendimia que se realiza y el traslado de la uva a la bodega, el tratamiento de la uva en bodega (despalillado, estrujado, etc.), así como el transporte y la conservación del vino hasta el consumidor final.

Una vez que la uva ha llegado a la bodega se controla la fermentación alcohólica, y en el caso de los vinos tintos, también la fermentación maloláctica. Todo el proceso de elaboración del vino conlleva además otra serie de tratamientos como los remontados, el descube, la crianza en barricas, estabilización, clarificación, filtración, embotellado, etc.

En todos y cada uno de los pasos, que se muestran en la Figura 1, pueden participar microorganismos, en algunos casos de forma muy necesaria, ya que sin su concurso no se produciría la vinificación, como son los casos de las fermentaciones alcohólica y maloláctica, y en otros casos la presencia de microorganismos puede dar lugar a la aparición de defectos en el vino final.

¹ Boulton, R.B., Singleton, V.L. Teoría y práctica de la elaboración del vino (2002). ISBN 978-84-200-0978-0

² Blouin, J., Peynaud, E. Enología práctica: Conocimiento y elaboración del vino (2003). ISBN 84-8476-160-6



Figura 1. Esquema de elaboración de vino. Imagen tomada de <https://cepabosquet.es/index.php/elaboracion-vino-tinto>

1.2. Importancia de la industria del vino en España

Los tres principales países productores de vino del mundo (España, Francia e Italia) representan el 85% del vino de Europa y el 52% del mundo, con participaciones entre el 0,5 y el 0,75 % de su PIB respectivo. Este porcentaje, aunque sea inferior al 1%, es elevado, ya que en España la elaboración de bebidas alcohólicas está entre los 10 sectores industriales principales. En términos monetarios el sector vitivinícola en España supone más de 4000 millones de euros, siendo proporcionalmente el país del mundo en el que más contribuye a su riqueza. Todos los datos estadísticos del sector vitivinícola en el mundo son publicados anualmente por la OIV³.

La evolución en el consumo del vino presenta una tendencia hacia la disminución del consumo del vino de mesa y al aumento de los vinos de calidad. El uso del vino como alimento es cada vez menor y, sin embargo, está ganando importancia en el aspecto de la cultura del vino.

Debido a la gran importancia económica del vino, a la legislación que se aplica, que regula cada vez más aspectos de los procesos de vinificación y aplica límites a un mayor número de compuestos que pueden estar presentes en los vinos, y a que el consumidor es cada vez más sensible a la calidad, los enólogos han de controlar el proceso de manera más exhaustiva si cabe.

Como indica Recasens⁴: *“El sector vitícola está incluido dentro de la rama agroalimentaria. La parte productora tiene una base agrícola sometida al entorno natural en el que se encuentra. La parte elaboradora la constituye una industria de transformación compleja y heterogénea. Esta muy afectado por los diferentes canales de distribución que sitúan el producto al alcance de la gente. Finalmente, tiene un consumo especial en comparación con los otros productos de alimentación, unido a una componente*

³ Organización Internacional de la Vid y el Vino. Actualidad de la coyuntura del sector vitivinícola mundial en 2020.

⁴ Recasens, M. Economía vitivinícola en el siglo XXI. ACE Revista de Enología. (Julio 2003).

de apreciación y valoración subjetiva muy importante. Además, se trata de uno de los sectores más regulados e intervenidos por las distintas Administraciones del Estado.”

1.3. Microorganismos que participan en las vinificaciones

En enología hay dos tipos de microorganismos con importancia en el proceso de transformación del mosto en vino. Por un lado, las levaduras responsables de la fermentación alcohólica que transforman los azúcares en etanol, y por otro, las bacterias lácticas responsables de la fermentación maloláctica que transforman el ácido málico en ácido láctico.

Además, hay también otros microorganismos, como las bacterias acéticas, los mohos, las levaduras del género *Brettanomyces*, etc., que pueden producir alteraciones en los vinos, influyendo negativamente en su calidad.

Los microorganismos presentes en la vinificación proceden de la uva y del ecosistema de la bodega⁵. También es habitual añadir levaduras y/o bacterias lácticas comerciales (provenientes de cultivos seleccionados) durante la vinificación.

1.3.1. Las levaduras y la fermentación alcohólica

Las levaduras que participan en la fermentación alcohólica las podemos agrupar en dos tipos, las pertenecientes a la especie *Saccharomyces (S.) cerevisiae* y el resto, que comúnmente denominamos no-*Saccharomyces*.

S. cerevisiae es la levadura dominante del proceso, sobre todo cuando aumenta el contenido en etanol en los depósitos, debido a su mayor resistencia a este compuesto. Las levaduras no-*Saccharomyces* se detectan principalmente al inicio de la fermentación alcohólica, aunque algunas especies permanecen hasta bien avanzada la fermentación⁶.

La fermentación alcohólica normalmente se describe como la transformación los azúcares de la uva en etanol y dióxido de carbono. Pero el desarrollo de las levaduras en el mosto también implica la degradación y formación de otros compuestos que dan lugar a perfiles distintos de los vinos dependiendo del tipo de levaduras presentes, al metabolizar los compuestos de diferente manera.

Como decía Pasteur en 1876: “Las cualidades del vino dependen en gran parte de la naturaleza específica de las levaduras que se desarrollan durante la fermentación de los mostos. Podemos pensar que si se sometiera a un mismo mosto a la acción de levaduras distintas se lograrían vinos de distinta naturaleza”

⁵ Garijo, P., López, R., Santamaría, P., Ocón, E., Olarte, C., Sanz, S., Gutiérrez, A.R. Presence of lactic bacteria in the air of a winery during the vinification period. *International Journal of Food Microbiology*. 136-1 (2009) 142-146. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.018

⁶ Ultee, A., Wacker, A., Kunz, D., Löwenstein, R., König, H. Microbial Succession in Spontaneously Fermented Grape Must Before, During and After Stuck Fermentation. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 34-1 (2013) 68-78. DOI 10.21548/34-1-1082

Hay más de cien especies de levaduras y cientos de cepas diferentes en la microbiota de la vid, que forman parte del “terroir”. El concepto “terroir” está integrado por las condiciones ambientales, el suelo, la geografía, la fauna, la flora, la microbiota, y contribuiría a crear vinos característicos del mismo. El papel de la flora microbiana asociada a la vid se comenzó a estudiar en profundidad cuando se desarrollaron técnicas genéticas para identificar masivamente las diferentes especies⁷.

En los años 90 del siglo XX algunos enólogos desarrollaron la idea de que la manipulación mínima de la uva, y el evitar algunas prácticas enológicas, mejoraban la calidad del vino⁸. Comenzaron a entender que el “terroir” microbiano existe y puede influir en el vino⁹. El aumento de la diversidad de levaduras aumenta la complejidad organoléptica, y puede permitir a los enólogos expresar las diferencias del “terroir” en sus vinos¹⁰. Aplicar las mismas cepas comerciales en diferentes regiones vitivinícolas puede dar lugar a vinos de características similares. El concepto de “terroir” sigue siendo muy discutido, pero está demostrado que es una de las características clave en muchos vinos¹¹.

Además del “terroir”, el desarrollo de la fermentación alcohólica está condicionado por factores tales como el pH, la temperatura de fermentación, el sulfuroso libre, el nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) o la presencia de toxinas y fungicidas en el mosto. Un ejemplo de esto último sería la relación entre el contenido en el mosto de nitrógeno fácilmente asimilable y la aparición de moléculas indeseables en el vino¹².

1.3.2. Las bacterias lácticas y la fermentación maloláctica.

Las bacterias lácticas realizan la fermentación maloláctica, transformando el ácido málico en ácido láctico y dióxido de carbono. Sucede habitualmente tras la fermentación alcohólica, sobre todo en los vinos tintos. Hay casos en los que la fermentación maloláctica no es deseada, como en los vinos blancos,

⁷ Carrau, F., Bodoia, E., Ramey, D. Yeasts for low input winemaking: Microbial terroir and flavor differentiation. *Advances in Applied Microbiology*, 111 (2020) Chapter 3. DOI 10.1016/bs.aambs.2020.02.001

⁸ Ramey, D. In Stockley, C.S., Johnstone, R.S. Low input winemaking – Let nature do the work. Lee, T.H., Sas, A.N. (Eds). *Proceedings Australian wine industry technical conference*. Adelaide, Australia. 26-29

⁹ Gilbert, J.A., van der Lelie, D., Zarraonaindia, I. Microbial terroir for wine grapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111 (2014) 5-6. DOI 10.1073/pnas.1320471110

¹⁰ Lappa, I.K., Kachrimanidou, V., Pateraki, C., Koulougliotis, D., Eriotou, E., Kopsahelis, N. Indigenous yeasts: emerging trends and challenges in winemaking. *Current Opinion in Food Science*. 32 (2020) 133-143. DOI 10.1016/j.cofs.2020.04.004

¹¹ Pretorius, I.S. Tasting the terroir of wine yeast innovation. *FEMS Yeast Research*. 20-1 (2020). DOI 10.1093/femsyr/foz084

¹² Gutiérrez Linares, A. Nitrogen metabolism in wine yeast during alcoholic fermentation: effect on growth, fermentation activity and aroma production. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 2013

excepto en los que van a ser envejecidos, o en casos de vinos tintos que van a ser de consumo rápido y se desea la acidez y el frescor aportados por el ácido málico¹³.

Las principales bacterias lácticas encontradas en los vinos son: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus damnosus* y *Pediococcus pentosaceus*¹⁴. Así como la fermentación maloláctica es producida principalmente por *Oenococcus oeni*, muchas de estas bacterias pueden ser alterantes, como es el caso de las heterofermentativas (*L. mesenteroides*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. hilgardii*) que pueden producir ácido acético a partir de las pentosas, o bacterias productoras de aminas biógenas (*L. hilgardii*, *P. parvulus*), o de carbamato de etilo (*L. brevis*, *L. buchneri*)¹⁴.

La población de bacterias lácticas en las uvas es baja¹⁵. En el mosto y al comienzo de la fermentación alcohólica aumenta la población de bacterias lácticas de algunas especies, dependiendo del sulfitado. En la fermentación alcohólica disminuye la población, y se da una selección a favor de las especies más resistentes al alcohol y pH. Al terminar la fermentación alcohólica las levaduras comienzan a disminuir y aumenta la población de bacterias lácticas, principalmente *Oenococcus oeni*, comenzando la fermentación maloláctica.

Con la fermentación maloláctica se producen una serie de cambios beneficiosos para los vinos tintos, especialmente si van a ser dedicados a crianza, ya que se obtiene estabilidad biológica en el tiempo y aumenta la complejidad aromática del vino^{16,17}. La fermentación maloláctica reduce la acidez, reduce los aromas herbáceos, genera aromas más complejos, disminuye la astringencia, mejora la estabilidad del color y la estabilidad microbiológica. Pero también tiene aspectos perjudiciales como el aumento del pH y la acidez volátil, la desaparición de algunos aromas afrutados y varietales, y la formación de diacetilo y aminas biógenas.

¹³ Morata, A., Bañuelos, M.A., López, C., Chenli, S., Vejarano, R., Loira, I., Palomero, F., Lepe, J.A.S. The oenological interest of fumaric acid: Stop malolactic fermentation and preserve the freshness of wines. BIO Web of Conferences 15, 02034 (2019). DOI 10.1051/bioconf/20191502034

¹⁴ Lonvaud-Funel, A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. Anton Leeuw. 76-1-4 (1999) 317-331. DOI 10.1023/A:1002088931106

¹⁵ Fundación para la Cultura del Vino. Bacterias lácticas y fermentación maloláctica. En informe Técnico III. Encuentro Enológico; "Fermentación Maloláctica". Madrid 15 marzo 2006. 22-29

¹⁶ Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. Handbook of enology. The microbiology of Wine and Vinifications. Vol.I (2000). Wiley. West Sussex. England. ISBN-13: 978-0-470-01034-1

¹⁷ Hidalgo, J. Tratado de Enología. Tomos I y II. (2003). Mundi-Prensa. Madrid. ISBN 8484767515

1.4. Microorganismos alterantes de los vinos

Los diversos microorganismos presentes en el vino han sido y son objeto de numerosos estudios¹⁸, donde se detallan algunas de las especies que participan en la elaboración del vino, y algunas de las causantes de problemas en el mismo. Entre estas últimas podemos citar levaduras como *Candida mycoderma* causante de un velo blanquecino en el vino conocido como flor, o *Brettanomyces*, bacterias como *Acetobacter aceti* causante del aumento de la concentración de ácido acético, etc. En otros estudios¹⁹ se describe en qué momento de la fermentación aumenta o disminuye la concentración de los microorganismos, su relevancia dentro del conjunto, etc. Yaqiong Liu y col. (2020)²⁰, describieron en vinos de la variedad “Marsala” la diversidad de bacterias y los compuestos aromáticos formados comparando fermentaciones espontáneas e inoculadas.

Los distintos estudios señalan la gran diversidad presente en la microbiota de los vinos, y la existencia de una serie de microorganismos que producen compuestos químicos no deseados, siendo este un factor de gran importancia en enología, ya que la presencia de estos microorganismos puede provocar que un vino sea rechazado por los consumidores, principalmente por alteraciones en la composición aromática.

Un buen resumen de microorganismos alterantes, alteraciones, detección y diferenciación de microorganismos fueron descritos por Considine y Frankish (2014)²¹. En este estudio entre otros microorganismos se describen las levaduras de la especie *Brettanomyces* spp.²², que es una levadura que puede presentarse en el vino durante la fermentación, pero sobre todo en periodos de crianza de los vinos, y que afecta al aroma y al gusto ya que genera dos moléculas, el 4-etilfenol y el 4-etilguaicol, compuestos responsables del aroma a cuadra, caballo, animal, cuero... Los vinos se consideran defectuosos dependiendo de la concentración de 4-etilfenol y 4-etilguaicol, las sinergias de estos con otros aromas, y las personas que van a consumir el vino, ya que no todo el mundo detecta o rechaza

¹⁸ Mesas, J.M., Alegre, M.T. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. Ciencia y Tecnología Alimentaria 2-4 (1999) 174-183. DOI 10.1080/11358129909487599

¹⁹ Ultee, A., Wacker, A., Kunz, D., Löwenstein, R., König, H. Microbial Succession in Spontaneously Fermented Grape Must Before, During and After Stuck Fermentation. South African Journal of Enology and Viticulture. 34-1 (2013) 68-78. DOI 10.21548/34-1-1082

²⁰ Liu, Y., Lu, Y., Sun, F., Wang, W., Wang, J., Sun, J., Mu, J., Gao, Z. Effects of spontaneous fermentation on the microorganisms diversity and volatile compounds during ‘Marselan’ from grape to wine. LWT- Food Science and Technology, 134 (2020) 110-193. DOI 10.1016/j.lwt.2020.110193

²¹ Considine, J.A., Frankish, E. A complete guide to Quality in small-scale wine making. Microbiology and methods, 6 (2014) 79-95. ISBN 978-0-12-408081-2

²² Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J. The challenge of *Brettanomyces* in wine. LWT- Food Science and Technology. 43 (2010) 1474-1479. DOI 10.1016/j.lwt.2010.06.010

estos aromas de la misma forma. También hay otras levaduras que pueden generar fenoles en el vino, como *Pichia spp.*²³.

Algunos mohos^{24,25} pueden causar en la uva la podredumbre gris, causada por el desarrollo de *Botrytis cinerea* en las uvas, y que da lugar a vinos prácticamente imbebibles, con grandes pérdidas en el viñedo. Pero en ciertas condiciones este tipo de mohos causan la denominada podredumbre noble, que pasifica las uvas y consigue vinos como los Tokaji. Otro problema derivado de la presencia de hongos es la transformación de compuestos halofenolados en haloanisoles causantes de aromas a humedad o “corcho”, o la formación de geosmina, isoborneol, octenona (aroma a champiñón), y pirazinas (aromas a “verde”, espárrago...). Este defecto está provocado por las especies *Penicillium spp.*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus spp.*, *Actinomycetes*, *Rhizobium spp.*, *Streptomyces...* y se produce durante la conservación de los vinos, principalmente durante la crianza en botella, porque los precursores de los aromas pueden proceder del corcho. Además, *Aspergillus* y *Penicillium* pueden sintetizar cantidades significativas de ocratoxina A, toxina con límite legislativo cuya presencia hay que controlar en el vino.

Las bacterias acéticas y las lácticas son las principales causantes de desviaciones en los vinos al producir aromas negativos (geranio, mantequilla...), aumentar la acidez volátil y las aminas biógenas, generar carbamato de etilo, amargor, ahilado, etc^{14, 18}.

1.5. Las bacterias acéticas en vinificación

1.5.1. Características generales

Las bacterias acéticas son aerobias estrictas, Gram negativas, no esporuladas, de forma elipsoidal o redondeada. Son bacterias acidogénicas, cuyo pH óptimo de crecimiento está entre 5 y 6.5, pero pueden crecer a pH entre 3 y 4. Su temperatura óptima de crecimiento es de 25-30 °C, pero se pueden desarrollar a otras temperaturas, con un crecimiento más débil. Son ubicuas en la naturaleza, y obtienen la energía principalmente de la transformación de los azúcares y el etanol en ácido acético²⁶.

²³ Saez, J.S., Lopes, C.A., Kirs, V.E., Sangorrín, M. Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. Food Microbiology. 28-3 (2011) 503-509. DOI 10.1016/j.fm.2010.10.019

²⁴ Harwood, G. Microbiology and chemistry of corks taints in wine. In G.H. Fleet (ed) Wine microbiology and biotechnology. In G.H. Fleet (ed) Academic Publishers, Chur, Switzerland. 353-372. ISBN 0415278503

²⁵ Simpson, R.F., Capone, D.L., Sefton, M.A. Isolation and Identification of 2-Methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a potent musty compound from wine corks. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52 (2004) 5425-5430. DOI 10.1021/jf049484z

²⁶ Guillamón, J.M., Mas, A. Acetic Acid Bacteria. Molecular Wine Microbiology. Chapter 9 (2011). DOI 10.1016/B978-0-12-375021-1.10009-8

1.5.2. Clasificación

La clasificación de las bacterias acéticas ha variado a lo largo del tiempo, y sobre todo en los últimos años al aplicar nuevas tecnologías de biología molecular, lo que está produciendo casi de forma continuada un reordenamiento de los géneros y especies conocidas. A principios del siglo XIX se les denominó *Mycoderma* y a finales de siglo *Acetobacter*. En 1935 se introdujo el género *Gluconobacter*, y a partir de ahí han ido aumentando los géneros descritos. En 2008 Yamada y Yukphan²⁷ reconocieron diez géneros. Entre 2008 y 2015 se añadieron otros 9 géneros y nuevas especies. En 2015 eran reconocidos 19 géneros²⁸ (*Acetobacter*, *Acidomonas*, *Ameyamaea*, *Asaia*, *Bombella*, *Commensalibacter*, *Endobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Granulibacter*, *Komagataeibacter*, *Kozakia*, *Neosaia*, *Neokomagataea*, *Nguyenibacter*, *Saccharibacter*, *Swaminathania*, *Swingsia* y *Tanticharoenia*) y 72 especies, de entre las cuales, las más habituales en enología son *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pastorianus* y *Gluconobacter oxydans*²⁹.

1.5.3. Metabolismo

Las bacterias acéticas son metabólicamente activas desde el momento en que la uva está en el campo. Cuando la uva está dañada la población de bacterias aumenta al acceder más fácilmente a los nutrientes. Las bacterias acéticas presentan un metabolismo aerobio estricto, con diferentes rutas metabólicas en función de la fuente de carbono utilizada.

1.5.3.1. Metabolismo del etanol

La característica principal de las bacterias acéticas es la oxidación de etanol a ácido acético. Se produce en dos fases, primero el etanol se transforma en acetaldehído que posteriormente pasa a ácido acético con ayuda de los enzimas alcohol deshidrogenasa (ADH) y acetaldehído deshidrogenasa (ALDH) (Figura 2). Las bacterias acéticas del género *Acetobacter* utilizan esta ruta.

²⁷ Yamada, Y., Yukphan, P. Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 125 (2008) 15-24. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.077

²⁸ Trček, J., Barja, F. Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *International Journal of Food Microbiology*. 196 (2015) 137-44. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.003

²⁹ Bartowsky, E.J.P., Henschke, A. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine. A review. *International Journal of Food Microbiology*, 125 (2008) 60-70. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.016

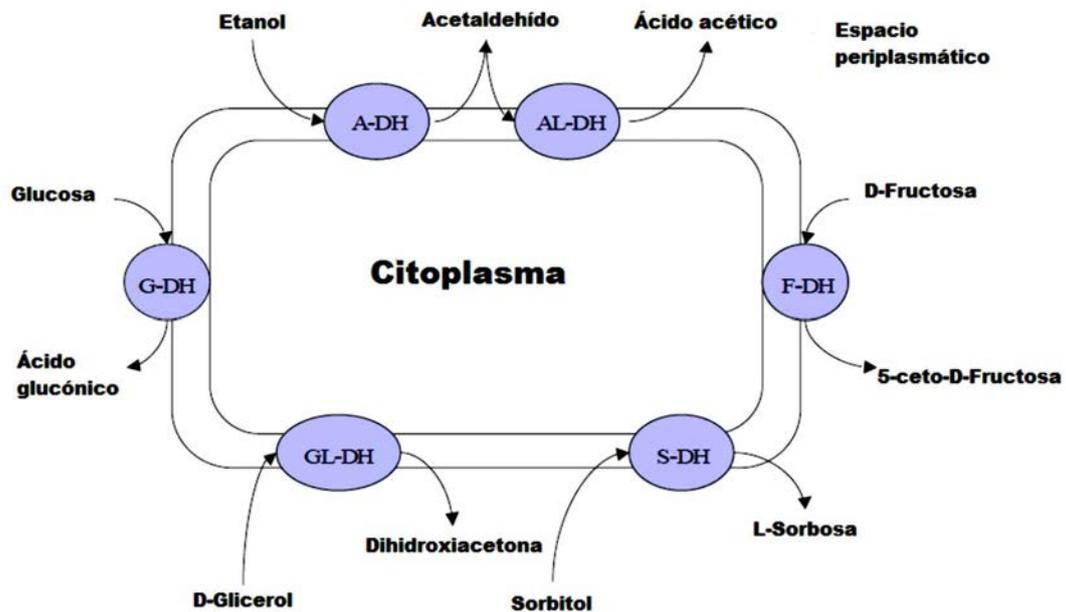


Figura 2. Ciclo del metabolismo del etanol³⁰.

Las bacterias acéticas pueden ser consideradas como los microorganismos mejor adaptados al medio alcohólico porque son capaces de usar el etanol y obtener energía a partir de él. Por ello, pueden encontrarse con facilidad en vinos de 15 % (v/v).

1.5.3.2. Metabolismo de otros alcoholes

El glicerol principalmente, y también propanol, butanol y otros polialcoholes, pueden ser transformados por las bacterias acéticas en sus respectivas cetonas (cetogénesis) o cetosas. Las cantidades son bajas, pero puede ser un método usado en biotecnología para síntesis de compuestos³¹.

³⁰ Mabel Gerard, L. Caracterización de bacterias del ácido acético destinadas a la producción de vinagres de frutas. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia (2015)

³¹ Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., Prust, C. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. Applied Microbiology and Biotechnology. 60-3 (2002) 233-42. DOI 10.1007/s00253-002-1114-5

1.5.3.3. Metabolismo de los azúcares

Las bacterias acéticas pueden utilizar diferentes carbohidratos, pero el principal es la glucosa. Se producirán las correspondientes aldosas, y de ahí la oxidación a ácidos aldónicos³² (Figura 3). Las bacterias acéticas del género *Gluconobacter* se caracterizan por usar esta vía.

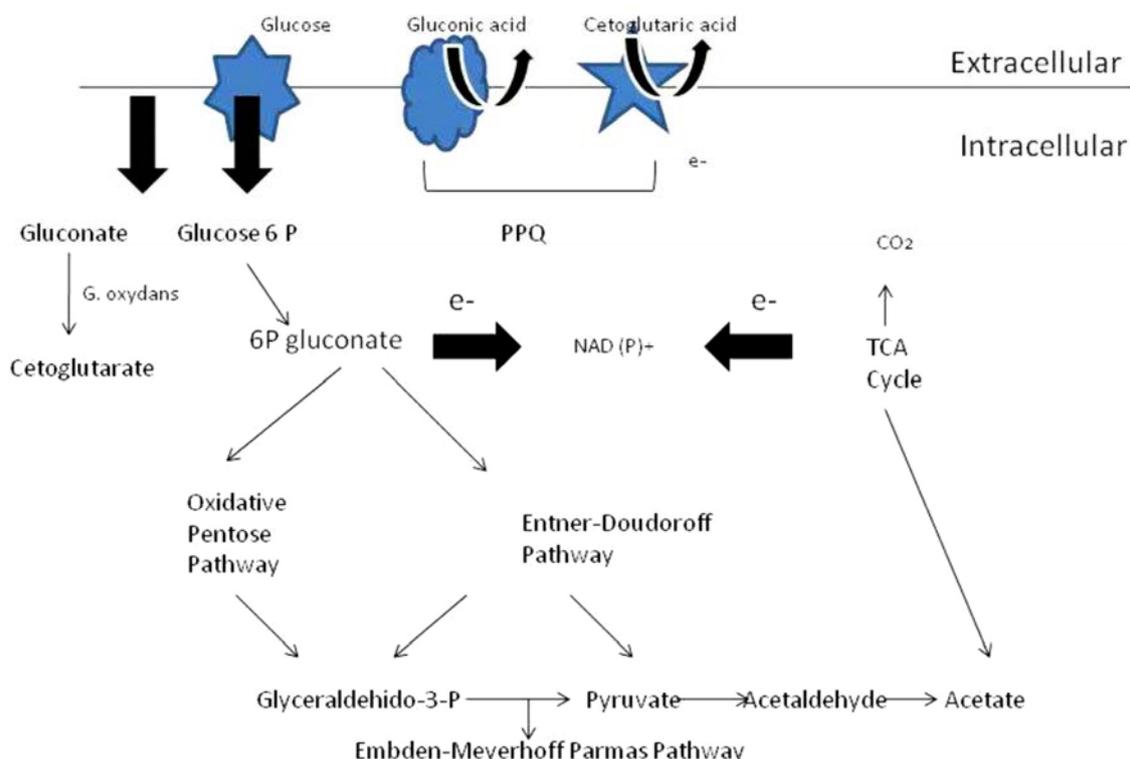


Figura 3. Ciclo del metabolismo de los azúcares³³.

1.5.3.4. Metabolismo de los ácidos orgánicos

La oxidación de los ácidos orgánicos por las bacterias acéticas se produce a través del ciclo de Krebs, obteniéndose CO₂ y H₂O. Se puede producir una oxidación incompleta y dar lugar a la formación de ácido

³² Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. Tratado de Enología. Microbiología del vino. (2003) Ed. hemisferio sur. Buenos Aires. Argentina. ISBN 9505045719

³³ Jara Campos, C.I. Desarrollo de métodos de biología molecular para el análisis directo de bacterias acéticas de vinagre. Tesis doctoral. Universitat Rovira i Virgili (2009). ISBN:978-84-692-3226-2/DL:T-918-2009

acético sin llegar a degradarse hasta CO₂ y H₂O. *Gluconobacter*, al contrario que *Acetobacter*, no puede realizar el ciclo y no metaboliza la mayoría de los ácidos orgánicos³⁴.

1.5.3.5. Metabolismo del nitrógeno

Algunas especies de los géneros *Gluconoacetobacter*, *Acetobacter* y *Swaminathania*, son diazótroficas, capaces de fijar el nitrógeno atmosférico y reducirlo a amonio³⁵, y la mayoría usan el nitrógeno inorgánico para sintetizar aminoácidos y compuestos orgánicos nitrogenados³⁶.

1.5.4. Efectos en el vino

La presencia de bacterias acéticas en un vino en el que se den las condiciones adecuadas (disponibilidad de oxígeno) para su crecimiento, puede llegar a producir la fermentación acética e incrementar la acidez volátil. Cuando ésta alcanza valores de entre 0,4 a 1,5 g/l, se suele considerar que el vino es inadecuado organolépticamente, aunque la concentración umbral depende del tipo de vino y del consumidor³⁷, un vino envejecido en barricas de roble puede tener una concentración de acético superior a 1 g/l y no detectarse organolépticamente, mientras que un vino rosado joven puede presentar un defecto organoléptico con 0,5 g/l.

Durante el proceso de elaboración y conservación del vino es muy difícil evitar la presencia de estos microorganismos, pues siempre hay una población residual que acompaña al vino²⁹ y puntualmente (por ejemplo, después de realizar remontados con aireación o tras el trasiego), pueden producir pequeñas cantidades de ácido acético. El problema se produce cuando tiene lugar un importante desarrollo de estos microorganismos y se generan importantes cantidades de este ácido. Tradicionalmente este problema se ha descrito en vinos mal conservados, sobre todo en contacto con el aire.

1.5.5. Control de las bacterias acéticas en la vinificación

Las bacterias acéticas son resistentes al sulfuroso, bajo pH, etanol, etc. Cuando terminan las fermentaciones alcohólica y maloláctica los vinos presentan poblaciones bajas, que pueden incrementarse cuando las condiciones de almacenamiento son inadecuadas (sulfitado insuficiente y contacto con el aire).

³⁴ Raspor, P., Goranovic, D. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28, 101-124. DOI 10.1080/07388550802046749

³⁵ Pedraza, R. O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125-1 (2008) 25-35. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.079

³⁶ De Ley, J., Gillis, M., Swings, J. Family VI. Acetobacteraceae. In N. R. Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1 (1984) 267–278. Williams y Wilkins, Baltimore. ISBN 978-0-387-24145-6

³⁷ Davis, C.R., Wibowo, D.J., Eschenbruch, R.E., Lee, T.H., Fleet, G.H. Practical implications of malolactic fermentation: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36 (1985) 290–301. DOI 10.5344/ajev.1985.36.4.290

En la tabla 1 se muestra la evolución de las principales bacterias acéticas durante la elaboración de un vino³⁸. Según este estudio, la especie mayoritaria al principio de la vinificación, *Gluconobacter oxydans*, es sustituida por *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter aceti* a medida que avanza el proceso.

Tabla 1. Evolución de la población de distintas especies de bacterias acéticas durante las diferentes fases del proceso de elaboración del vino. (Tomado de Joëux y col³⁸).

ETAPA FERMENTACIÓN		UFC/ml	Bacterias acéticas (%)
Mosto		> 10000	<i>G. oxydans</i> (100)
Fermentación alcohólica	3 días	3000	<i>G. oxydans</i> (20)
	7 días	100	<i>A. pasteurianus</i> (60)
	10 días Antes de trasiego	20	<i>A. aceti</i> (20)
	Tras trasiego	>10000	
Fermentación maloláctica	Comienzo	400	<i>A. pasteurianus</i> (20)
	3 meses	100	<i>A. aceti</i> (80)
Envejecimiento barrica	4 meses	200	<i>A. pasteurianus</i> (20) <i>A. aceti</i> (80)
	6 meses	900	<i>G. oxydans</i> (10) <i>A. pasteurianus</i> (30) <i>A. aceti</i> (60)
	9 meses	600	<i>A. pasteurianus</i> (20) <i>A. aceti</i> (80)
	11 meses	600	<i>A. aceti</i> (100)

³⁸ Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P. Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. Applied and Environmental Microbiology. 48-1 (1984) 153-156. DOI 10.1128/aem.48.1.153-156.1984

Estudios más recientes³⁹ han detectado en uvas, vinos o vinagres, numerosas especies de bacterias acéticas, al desarrollarse nuevas técnicas de detección. En la tabla 2 se muestra una lista de géneros y especies actualizada en 2007.

Tabla 2. Especies de bacterias acéticas descritas. En negrita se destacan las detectadas en mostos, vinos o vinagres. (Tomado de Mas³⁹).

<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>Acidomonas</i>
<i>A. aceti</i>	<i>Ga. liquefaciens</i>	<i>G. oxydans</i>	<i>Ac. methanolica</i>
<i>A. pasteurianus</i>	<i>Ga. diazotrophicus</i>	<i>G. frateurii</i>	
<i>A. pomorum</i>	<i>Ga. xylinus</i>	<i>G. assaii</i>	
<i>A. peroxydans</i>	<i>Ga. hansenii</i>	<i>G. cerinus</i>	<i>Kozakia</i>
<i>A. indonesiensis</i>	<i>Ga. europaeus</i>	<i>G. albidus</i>	<i>K. baliensis</i>
<i>A. tropicalis</i>	<i>Ga. oboediens</i>	<i>G. thailandicus</i>	
<i>A. syzygii</i>	<i>Ga. intermedius</i>		
<i>A. cebinongensis</i>	<i>Ga. sacchari</i>		<i>Saccharibacter</i>
<i>A. orientalis</i>	<i>Ga. entanii</i>	<i>Asaia</i>	<i>Sa. floricola</i>
<i>A. orleaniensis</i>	<i>Ga. johannae</i>	<i>As. bogorensis</i>	
<i>A. lovaniensis</i>	<i>Ga. azotocaptans</i>	<i>As. siamensis</i>	<i>Neoasaia</i>
<i>A. estuniensis</i>	<i>Ga. swingsii</i>	<i>As. krugthepensis</i>	<i>N. chiangmaiensis</i>
<i>A. malorum</i>	<i>Ga. kombuchae</i>		
<i>A. cerevisiae</i>	<i>Ga. nataicola</i>		<i>Granulibacter</i>
<i>A. oeni</i>	<i>Ga. rhaeticus</i>	<i>Swaminathania</i>	<i>Gr. bethesdensis</i>
<i>A. nitrogenifigens</i>	<i>Ga. Saccharivorans</i>	<i>S. salitolerans</i>	

Aunque las bacterias acéticas son aerobias estrictas, pueden sobrevivir en ambientes anaerobios o semianaerobios durante mucho tiempo. Por ello, los enólogos tratan de evitar que tras las fermentaciones alcohólica y maloláctica, los microorganismos residuales en el vino sigan desarrollándose. Para ello las principales herramientas empleadas son el mantenimiento de una dosis

³⁹ Mas, A., Torija, M.J., González, A., Poblet, M., Guillamón, J.M. Acetic acid bacteria in oenology. Contributions to Science. 3-4 (2007). DOI 10.2436/20.7010.01.27

adecuada de anhídrido sulfuroso y la conservación de los vinos al abrigo del aire. Para ello se practican rellenos en las barricas o los depósitos, se emplean gases inertes en los trasiegos, o se tumban las botellas. Sin embargo, el empleo de otras técnicas, como la microoxigenación, favorecen el desarrollo de bacterias acéticas⁴⁰.

Para minimizar el contenido de ácido acético en el vino es necesario controlar el contenido de azúcares residuales que favorecen el desarrollo de bacterias acéticas y conservar a menor temperatura para disminuir su actividad. Hay estudios que muestran que *A. aceti* tiene un crecimiento en el vino más lento a temperaturas menores de 18 °C. La temperatura óptima de crecimiento de bacterias acéticas está en torno a 30°C, pero se han detectado crecimientos de bacterias acéticas incluso a 10°C, aunque mucho más lentos³⁵. También es necesario, evitar la presencia de oxígeno por ser el principal factor limitante del crecimiento de bacterias acéticas (su ausencia no elimina las bacterias, pero sí impide su crecimiento y ralentiza su metabolismo). Otros factores a controlar son el estado sanitario de las uvas, ya que cuanto más sana es la uva menos bacterias hay, y el pH del vino, porque cuanto más bajo es, su desarrollo es menor. Otros puntos clave son las instalaciones de las bodegas y los depósitos de almacenamiento del vino. La limpieza de todas las superficies de la bodega que entran en contacto con el vino impide que éste se contamine con microorganismos indeseados adheridos a las superficies. El proceso de embotellado es uno de los puntos clave, ya que la entrada de oxígeno en la botella mediante el espacio de cabeza y a través del material de cierre puede dar lugar a microoxigenaciones.

Pero, aunque se controlen correctamente todos los puntos, las bacterias acéticas no son eliminadas del vino, tan solo se evita su desarrollo y metabolismo, y la formación de ácido acético. Para eliminarlas se debería hacer una filtración amicróbica con filtros de membrana que tengan un tamaño de 0,2 µm, técnica que no es habitual a nivel de bodega.

La facultad de las bacterias acéticas de presentar un estado celular adaptativo conocido como Bacterias Viables No Cultivables (BVNC), permite su supervivencia durante largos periodos de tiempo en condiciones desfavorables⁴¹. Existen numerosos estudios acerca de los microorganismos VNC, en los que se detallan cuáles son las causas de su formación, los factores que permiten su aparición, los procesos que siguen para su “resucitación” y las técnicas para poder estudiarlos. El problema que encontramos en las bacterias acéticas cuando están en estado VNC es que los análisis “tradicionales” no permiten su correcta detección, y pueden darse problemas de “picado acético” en vinos que se han analizado previamente y se consideran que no contienen bacterias acéticas⁴².

⁴⁰ Du Toit, W.J., Marais, J., Pretorius, I.S., du Toit, M. Oxygen in Must and Wine: A Review. South African Journal of Enology and Viticulture. 27-1 (2006) 76-93. DOI 10.21548/27-1-1610

⁴¹ Tamagnini, Paraje. ¿Qué son las bacterias viables no cultivables? (revisión bibliográfica). Revista Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 2-2 (2015) 99-102.
<https://revistas.unc.edu.ar/index.php/FCEFN/article/view/10745>

⁴² Millet, V., Lonvaud-Funel, A. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. Letters of Applied Microbiology. 30 (2000) 136-141. DOI 10.1046/j.1472-765x.2000.00684.x

1.5.6. Medidas curativas

Una vez que se ha generado el ácido acético, se pueden emplear diferentes estrategias para corregir el problema⁴³, teniendo en cuenta la legislación vigente⁴⁴. Cuando la presencia de ácido acético no es muy alta, y se detectan bacterias acéticas, lo que se debe hacer es disminuir su concentración o dificultar su capacidad de crecimiento. Se puede pasteurizar, hacer una filtración amicróbica o sulfitar adecuadamente⁴³. Cuando la cantidad de ácido acético es elevada, el problema tiene difícil solución. La eliminación o reducción del contenido de acetato de etilo y/o ácido acético en el vino se puede llevar a cabo refermentando el vino mezclándolo con un nuevo mosto y sembrando levaduras que hidrolicen estos compuestos, por ejemplo, con *Candida mycoderma*. Sin embargo, existe el riesgo de que el resultado final no tenga unas características deseadas. Se puede tratar el vino mediante una ósmosis inversa, nanofiltración y/o uso de resinas intercambiadoras. La eficiencia del método depende de la concentración de ácido acético, de la presión ejercida, del tipo de membrana, etc. Además, hay que tener en cuenta que el proceso no es sencillo ni barato⁴³ y puede bajar la calidad del vino final.

Otras técnicas que se pueden emplear son la estabilización microbiológica del vino contaminado y mezcla posterior con otros vinos. El problema suele ser que el vino así tratado pierde calidad organoléptica, y sus características dependerán del vino o vinos con los que se mezcle. La neutralización usando potasa cáustica, carbonato de potasio, carbonato de calcio o tartrato de potasio, consigue bajar ligeramente la concentración de acético, pero precipitan además sales derivadas de otros ácidos como por ejemplo tartratos, lo que hace necesaria una posterior corrección de la acidez⁴³.

El uso de levaduras inmovilizadas^{45,46}, es un procedimiento de desacidificación biológica que consiste en una refermentación asociada al consumo de ácido acético por las levaduras. Vinos con altas concentraciones de ácido acético se mezclan con uvas aplastadas, mosto u orujos de vinos terminados, en los que se inoculan levaduras capaces de disminuir la concentración de acético, como es el caso de la cepa comercial *Saccharomyces cerevisiae* S26, fijada a un soporte adecuado, por ejemplo, placas de quitosano.

⁴³ Vilela-Moura, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., Silva, R.D., Chaves, S.R., M.J.Sousa, M.Côrte-Real. The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine Quality: reduction of volatile acidity of grape musts and wines. *Applied Microbiology Biotechnology*. 89 (2011) 271-280. DOI 10.1007/s00253-010-2898-3

⁴⁴ Códice internacional de prácticas enológicas. OIV/2019

⁴⁵ Vilela, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., Côrte-Real, M. Reduction of volatile acidity of acidic wines by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied Microbiology Biotechnology*. 97 (2013) 4991-5000. DOI 10.1007/s00253-013-4719-y

⁴⁶ Vilela, A. Biological demalication and deacetification of musts and wines: Can wine yeasts make the wine taste better? *Fermentation*. 3-51 (2017). DOI 10.3390/fermentation3040051

1.6. Otros microorganismos productores de ácido acético

Aunque las bacterias acéticas son las principales productoras de ácido acético en vino, hay otra serie de microorganismos, que pueden producirlo. Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* generan pequeñas cantidades de ácido acético⁴⁷ durante la fermentación. Pero son las levaduras no-*Saccharomyces* (*Brettanomyces*⁴⁸, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Kloeckera apiculata*⁴⁹) las principales productoras. Las bacterias lácticas heterofermentativas (*O. oeni*, *Pediococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*) presentes en el vino también incrementan ligeramente la acidez volátil durante la fermentación maloláctica y durante la conservación de los vinos si se desarrollan en ellos. Las bacterias acetogénicas (*Acetobacterium* y *Clostridium*⁵⁰) también son capaces de producirlo, pero no son habituales en vino.

Las nuevas técnicas moleculares que se están aplicando al estudio de los vinos, van ampliando los conocimientos sobre la microbiota de los vinos, además de ir relacionando los microorganismos con procesos metabólicos. Esto hace que el número de microorganismos que conocemos que son capaces de generar ácido acético en el vino sea cada vez mayor, pero siguen siendo las bacterias acéticas las principales causantes del picado acético.

1.7. Aislamiento e identificación de las bacterias acéticas

Existen diversas técnicas para la determinación de la presencia bacterias acéticas en vino. Las más empleadas en bodega suelen ser los medios de cultivo sólidos. Técnicas más precisas como la PCR y la citometría de flujo se van implementando muy lentamente, debido a su precio y a que precisan de personal cualificado.

1.7.1. Medios de cultivo tradicionales

Hay numerosos medios de cultivo para el análisis de bacterias acéticas, pero en enología se suelen emplear principalmente los descritos por la Organización Internacional de la Viña y del Vino (OIV). En la resolución OIV/OENO 206/2010⁵¹ (Análisis microbiológico de vinos y mostos. Detección, diferenciación y recuento de microorganismos), se sugiere la utilización de tres medios para el recuento de Acetobacterias: GYC, G2 y Kneifel. Otro medio frecuentemente utilizado es el medio Wallerstein⁵². Estos

⁴⁷ Giudici, P., Zambonelli, C. Biometric and genetic study on acetic acid production for breeding of wine yeast. American Journal of Enology and Viticulture. 43 (1992) 370-374. DOI 10.5344/ajev.1992.43.4.370

⁴⁸ Freer, S.N. Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 18 (2002) 271-275. DOI 10.1023/A:1014927129259

⁴⁹ Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. Journal of Applied Bacteriology. 73 (1992) 126-130. DOI 10.1111/j.1365-2672.1992.tb01698.x

⁵⁰ Vidra, A., Németh, A. Bio-produced acetic acid: a review. Periodica Polytechnica Chemical Engineering. 62-3 (2018) 245-256. DOI 10.3311/PPch.11004

⁵¹ Resolución OIV/OENO 206/2010.

⁵² Bartowsky, E.J., Xia, D., Gibson, R.L., Fleet, G.H., Henschke, P.A. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. Letters in Applied Microbiology, 36 (2003) 307-314. DOI 10.1046/j.1472-765x.2003.01314.x

medios sólo permiten detectar y cuantificar las bacterias acéticas, pero no informan de la especie presente.

1.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR, reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica de biología molecular desarrollada en los años 80 del siglo XX⁵³, que partiendo de un fragmento de ADN lo amplifica generando un gran número de copias. La PCR tiene numerosas aplicaciones en diversos campos de la ciencia. Sobre su empleo para la detección de microorganismos en el vino existe abundante bibliografía^{54,55,56}, y se comercializan sondas y “primers” (cebadores) específicos para microorganismos enológicos⁵⁷.

La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (q-PCR) es una variante de la PCR empleada para cuantificar los microorganismos presentes en el medio analizado. En concreto, para la cuantificación de las bacterias acéticas en vino se han empleado variaciones de la técnica, como son la PCR-nido⁵⁸ o la técnica PCR con sondas Scorpion⁵². Cada vez se dispone de más estudios mediante PCR de bacterias acéticas en vino, y ya existen kits para su cuantificación (Zgardan y col. 2022)⁵⁹. En este caso sí se puede detectar la especie concreta de bacteria acética mediante técnicas como PCR-RFLP, PCR-DGGE, q-PCR o PCR-FISH, e incluso la cepa mediante técnicas como ERIC-PCR (Mas y col)³⁹.

⁵³ Bartlett J.M.S., Stirling D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. PCR Protocols. Methods in Molecular Biology, 226 (2003). Humana Press. DOI 10.1385/1-59259-384-4:3

⁵⁴ López, V., Fernández-Espinar, M.T., Barrio, E., Ramón, D., Querol, A. A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. International Journal of Food Microbiology. 81 (2003) 63-71. DOI 10.1016/s0168-1605(02)00194-0

⁵⁵ Savazzini, F., Martinelli, L. DNA analysis in wines: Development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification. Analytica Chimica Acta. 563 (2006) 274-282. DOI 10.1016/j.aca.2005.10.078

⁵⁶ Janagama, H.K., Mai, T., Han, S., Nadala, L., Nadala, C., Samadpour, M. Simultaneous detection of multiple wine-spoilage organisms using a PCR-based DNA dipstick assay. Journal of AOAC international 102-2 (2019). DOI 10.5740/jaoacint.18-0144

⁵⁷ ETS laboratoires. California. Scorpion genetic testing for spoilage organisms

⁵⁸ Guillamón, J.M., González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested PCR Microbiological Letters. 254 (2006) 123-128. DOI 10.1111/j.1574-6968.2005.000011.x

⁵⁹ Zgardan, D., Mitina, I., Mitin, V., Behta, E., Rubtov, S., Boistean, A., Munteanu, M. Acetic Acid Bacteria Detection in Wines by REAL-TIME PCR. Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry. 23-2 (2022) 179-188. ISSN 1582-540x

PCR-DGGE es una técnica que permite concretar con mayor profundidad la diversidad de las bacterias y seguir su evolución con el paso del tiempo^{60, 61}. DGGE (Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización) es una técnica de huella, rastreo o trazado molecular (molecular fingerprinting) que consiste en la separación de cadenas de ADN de doble cadena dependiendo de su punto de desnaturalización. Se consigue crear un gradiente desnaturalizante en un gel mediante la adición de sustancias químicas o por variación de temperatura. Se preparan amplificando por PCR fragmentos de 200 a 700 pares de bases de las zonas de interés, y se ponen en el gel. La migración del ADN en el gel hace que se vaya desnaturalizando y que se frene al formar cadena única, y entonces se proceden a identificar los fragmentos.

1.7.3. Citometría de flujo

La citometría de flujo está basada en el empleo de láseres para excitar moléculas fluorescentes y a través de unos detectores específicos, medir la radiación emitida por dichas moléculas⁶². Para ello, se añaden una serie de marcadores fluoróforos, que permite diferenciar los microorganismos buscados. La diferenciación se produce por el tamaño y el estado fisiológico del microorganismo. La técnica permite analizar miles de partículas por segundo, aumentar el número de biomarcadores para analizar diferentes tipos de células, y aumentar el número de detectores para discriminar mejor las partículas.

Por ello, cada vez hay más bibliografía sobre la aplicación de la citometría de flujo en vinos, y hay más casas comerciales que distribuyen citómetros de flujo en las bodegas⁶³. El uso principal en las bodegas es la detección de *Brettanomyces*, seguido del control de población de las levaduras durante la fermentación alcohólica. Pero también se pueden utilizar para detectar y cuantificar de forma específica bacterias tanto acéticas como lácticas⁶⁴.

1.7.4. MALDI-TOF

MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization Time of Flight) es una técnica de espectrometría de masas que emplea un láser como fuente de ionización y permite analizar la composición de diferentes elementos químicos midiendo los iones derivados de moléculas y separándolos en función de su relación masa / carga (m/z). De esta forma con MALDI-TOF se pueden

⁶⁰ Renouf, V., Strehaiano, P., Lonbaud, A. Yeast and bacteria analysis of grape, wine and cellar equipments by PCR-DGGE. Journal International Science Vigne et Vin. 41-1 (2007) 51-61. DOI 10.20870/oeno-one.2007.41.1.858

⁶¹ Ercolini, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. Journal of Microbiological Methods. 56 (2004) 297-314. DOI 10.1016/j.mimet.2003.11.006

⁶² Longobardi-Givan, A. Flow Cytometry: First Principles. (2001). Second ed. John Wiley & Sons, New York. ISBN 9780471382249

⁶³ Longin, C., Petitgonnet, C., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., Alexandre, H. Application of flow cytometry to wine microorganisms. Food Microbiology. 62 (2017) 221-231. DOI 10.1016/j.fm.2016.10.023

⁶⁴ Comas-Riu J., Rius N. Flow cytometry applications in the food industry. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 36 (2009) 999-1011. DOI 10.1007/s10295-009-0608-x

tipificar microorganismos a niveles de género y especie. Se basa en el estudio del perfil proteico específico de cada microorganismo o del análisis de sus ácidos nucleicos.

Previamente al análisis por MALDI-TOF, los microorganismos se deben obtener a partir de un cultivo en medio sólido o líquido. Deben ser cultivos puros, de no más de 48 horas para evitar esporas, productos metabólicos o autólisis.

Sus ventajas son un alto rendimiento, bajo coste de los reactivos, uso en muestras sólidas, rapidez y alta eficiencia en la identificación. Por el contrario, sus inconvenientes son el alto coste de los equipos y que el perfil proteico del microorganismo a identificar debe estar incluido en la base de datos Maldi-Biotyper^{65, 66, 67}.

1.7.5. Secuenciación

La secuenciación genética es una técnica que permite determinar la secuencia del ADN de cada microorganismo. A lo largo del tiempo se han ido desarrollando nuevas tecnologías que permiten obtener más información del microorganismo estudiado y de manera más simple y rápida. Una referencia sigue siendo la secuenciación de Sanger o enzimática, que está basada en el uso de DNA polimerasa. Posteriormente se desarrolló la secuenciación química desarrollada por Maxam y Gilbert, que consiste en usar reactivos químicos que generan fragmentos de diferente medida marcados radiactivamente y posteriormente se lee la secuencia del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa. La secuenciación de Sanger está considerada como de primera generación, después han ido surgiendo las técnicas de segunda y tercera generación, llamadas NGS (Next Generation Sequencing)⁶⁸.

1.7.6. Secuenciación masiva

Este tipo de secuenciación permite la identificación rápida, específica, reproducible y de forma independiente del cultivo de las especies existentes en una determinada muestra y en un momento concreto (Portillo et al., 2016). La secuenciación masiva permite determinar la secuencia de ADN de un

⁶⁵ Andrés-Barrao, C., Benagli, C., Chappuis, M., Ortega Pérez, R., Tonolla, M., Barja, F. Rapid identification of acetic acid bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology*, 36 (2013) 75-81. DOI 10.1016/j.syapm.2012.09.002

⁶⁶ Zhang, J., Plowman, J.E., Tian, B., Clerens, S., On, S.L.W. Predictive potential of MALDI-TOF analyses for wine and brewing yeasts. *Microorganisms*. 10 (2022) 265. DOI 10.3390/microorganisms10020265

⁶⁷ Vallet-Courbin, A., Lucas, M., Dutilh, L., Miot-Sertier, C., Windholtz, S., Lucas, P., Masneuf-Pomarede, I., Maupeu, J. Identification of enological yeasts and bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. *IVES Technical Reviews*. 2022. DOI 10.20870/IVES-TR.2022.5534

⁶⁸ Kirioglou, D., Lleixa, J., Mas, A., Portillo, M.C. Massive sequencing: A new tool for the control of alcoholic fermentation in wine? *Fermentation* (2018) 4 (7). DOI 10.3390/fermentation4010007

gran número de genes, generando de forma paralela y masiva millones de fragmentos de ADN en un único proceso de secuenciación⁶⁹.

En primer lugar, se generan fragmentos de distinto tamaño de ADN, y después se unen con unas moléculas (adaptadores), el conjunto se denomina librería. Opcionalmente se puede hacer un enriquecimiento seleccionando solamente las áreas de interés, empleando métodos de captura por hibridación en fase sólida o por métodos de amplificación mediante PCR. El material amplificado se une a una superficie sólida para llevar a cabo la secuenciación del material genético. Finalmente se crean archivos con la información de la secuenciación y alineamiento de las lecturas con un genoma de referencia. El avance de herramientas bioinformáticas permite desarrollar las técnicas NGS avanzando en rapidez y sencillez.

Dependiendo de la plataforma disponible en el mercado se emplean diferentes técnicas de secuenciación: secuenciación semiconductor (Ion Torrent), terminación reversible cíclica (Illumina), secuenciación en tiempo real (Pacific Biosciences), basado en nanoporos (Oxford Nanopore Systems), observación directa con microscopía (ZS Genetics) ...

Estas herramientas genéticas tienen todavía un coste elevado y la interpretación de los resultados es compleja, lo que dificulta su empleo en las bodegas.

⁶⁹ Portillo, M.C., Mas, A. Analysis of microbial diversity and dynamics during wine fermentation of grenache grape variety by High-Throughput Barcoding Sequencing. LWT – Food Science Technology. 72 (2016) 317-321. DOI 10.1016/j.lwt.2016.05.009

JUSTIFICACIÓN



2. JUSTIFICACIÓN

Los cambios en los procesos de vinificación en los últimos años (microoxigenación, adición de nutrientes, enzimas, reducción de los niveles de sulfuroso empleados...), unidos a los efectos del cambio climático, están dando lugar a vinos con unas características que favorecen el desarrollo de microorganismos y al aumento del contenido de ácido acético, tanto en los vinos jóvenes como en los envejecidos o sometidos a crianza.

Los análisis realizados por laboratorios certificados, como, por ejemplo, Laboratorios Dolmar Tentamus (empresa dedicada principalmente al análisis enológico con certificado ISO 17025), permite constatar mediante el análisis de una gran cantidad de muestras de diferentes añadas, procedencias y variedades, que cada vez es más frecuente encontrar vinos con problemas derivados de la presencia de bacterias acéticas, circunstancia ya constatada por Bartowsky et al. (2008)²⁹ y Kacaniova et al. (2013)⁷⁰.

La preocupación de las bodegas ha ido en aumento porque no disponen de medios sencillos que les permita la detección precoz de microorganismos capaces de generar ácido acético. La OIV indica el uso de unos medios de cultivo sólidos para el análisis de bacterias acéticas en vino, que no siempre funcionan bien, debido a su baja especificidad. Se han ido diseñando medios de cultivo (Kim et al. 2019⁷¹) en placa que están dando mejores resultados en muestras inoculadas, difiriendo en todos los casos en la proporción de los ingredientes de cada medio, pero que siguen siendo bastante deficientes cuando hay microorganismos viables pero no cultivables.

El uso de la técnica PCR proporciona muy buenos resultados en la detección y cuantificación de bacterias acéticas, pero la mayoría de las bodegas no pueden realizar este tipo de análisis por no disponer de la técnica en sus laboratorios y porque externalizarlos resulta bastante caro.

Este hecho hace necesario el desarrollo de métodos de análisis que las bodegas puedan implantar de forma sencilla y económica en sus instalaciones para el seguimiento de sus vinos, principalmente en la etapa de conservación y tras el embotellado.

Por ello, en este trabajo se trató de diseñar un medio de cultivo específico capaz de detectar la presencia de bacterias acéticas en bajas concentraciones de una forma fácil y rápida, y que pudiera utilizarse en las bodegas de forma preventiva para evitar incrementos inesperados de ácido acético durante la conservación de los vinos. Para su diseño, se tomó como modelo el método olfatométrico empleado para el análisis de *Brettanomyces* (Sniff Brett) que ha sido empleado durante años por Laboratorios Dolmar Tentamus.

⁷⁰ Kantor, A., Kacaniova, M., Pochop, J., Petrova, J., Hleba, L., Felsociova, S., Pavelkova, A., Rovna, K., Bobkova, A. Lactic acid and acetic acid bacteria isolated from red wine. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2 (2013) 1704-1715. Retrieved from <https://office2.jmbfs.org/index.php/JMBFS/article/view/7265>

⁷¹ Kim, D.H., Chon, J.W., Kim, H., Seo, K.H. Development of a novel selective medium for the isolation and enumeration of acetic acid bacteria from various foods, Food Control (2019). DOI 10.1016/j.foodcont.2019.106717

OBJETIVO



3. OBJETIVO

El objetivo de esta tesis fue el desarrollo de un medio de cultivo líquido “semicuantitativo”, capaz de detectar de forma preventiva la presencia de bacterias acéticas en el vino, que fuera económicamente viable y de fácil uso en bodega por personal sin cualificación.

MATERIALES

Y

MÉTODOS



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ensayos

4.1.1. Secuenciación masiva de vinos contaminados

El objetivo inicial de esta tesis fue identificar especies no convencionales de bacterias que pudieran estar implicadas en aumentos inesperados de la acidez volátil durante la conservación de vinos que no habían mostrado crecimiento al sembrarlos en los medios de cultivo recomendados. Para ello se eligieron dos vinos tintos de las añadas 2016 y 2017 que contenían una concentración de ácido acético de más de 1,5 g/l y en los que no se habían detectado poblaciones viables en diferentes medios de cultivo. El análisis mediante una técnica de secuenciación masiva (NGS) permitió estudiar la microbiota de los vinos seleccionados por sus problemas con la concentración de ácido acético. En primer lugar, se congelaron los vinos a -80 °C en viales de 10 ml y posteriormente se extrajo su ADN con el kit de suelos DNeasy Powersoil (Quiagen), siguiendo el protocolo descrito por González-Arenzana et al⁷¹. El ADN extraído se analizó mediante secuenciación masiva por la empresa Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Los genes marcadores se enfocaron en la región V3-V4 del rRNA 16S para las bacterias y la región 18S para hongos y levaduras. La plataforma Illumina se empleó para la fragmentación y la ligadura en una sola etapa, y el análisis bioinformático de los resultados lo llevó a cabo la misma empresa. La asignación de unidades operacionales taxonómicas (OTUS), equivalentes a géneros o especies, se realizó mediante la secuencia del 16S rDNA y su comparación con la base de datos de secuencias de RDP (Ribosomal Database Project), que es la principal base de datos de secuencias de ADNr (tanto de 16S, como de 23S de procariontes y de 18S y 28S de eucariotas)

4.1.2. Análisis de la eficacia de los medios de cultivo disponibles en la detección de Bacterias Acéticas (BA)

Se analizó la eficacia de los tres medios de cultivo sólidos sugeridos por la OIV⁷² (GYC, G2 y Kneifel) y otro adicional Wallerstein⁷³ (WLL), para la detección de BA en vino.

Los medios de cultivo se prepararon con agua desionizada, se puso medio litro en un frasco de vidrio y se precalentó a unos 60 °C, se añadieron los diferentes componentes del medio, agitando constantemente hasta su disolución, seguidamente se añadió el resto del agua, calentando cuando fue preciso hasta ebullición. El frasco con el medio de cultivo se esterilizó en el autoclave a 121 ± 3 °C durante quince minutos y se dejó enfriar hasta 70 °C antes de distribuirlos en placas Petri en campana de flujo. Se dejó enfriar y solidificar en una superficie horizontal. (Figura 4, medios ya terminados)

⁷² Resolución OIV/OENO 206/2010

⁷³ Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. E.J. Bartowsky, D. Xia, R.L. Gibson, G.H. Fleet, P.A. Henschke. (2003) Letters in Applied Microbiology. 36. 307-314

Para el estudio, se partió de 25 vinos comerciales que se sembraron en superficie a razón de 1 ml en los medios sólidos. Las placas se incubaron a 30°C durante dos semanas junto con una placa control (sembrada con un vino con una cantidad conocida de *A. aceti*), evaluando los resultados a los diez y catorce días. Los resultados se compararon con los obtenidos mediante análisis por PCR cuantitativa (apartado 4.4.3) de dichos vinos.

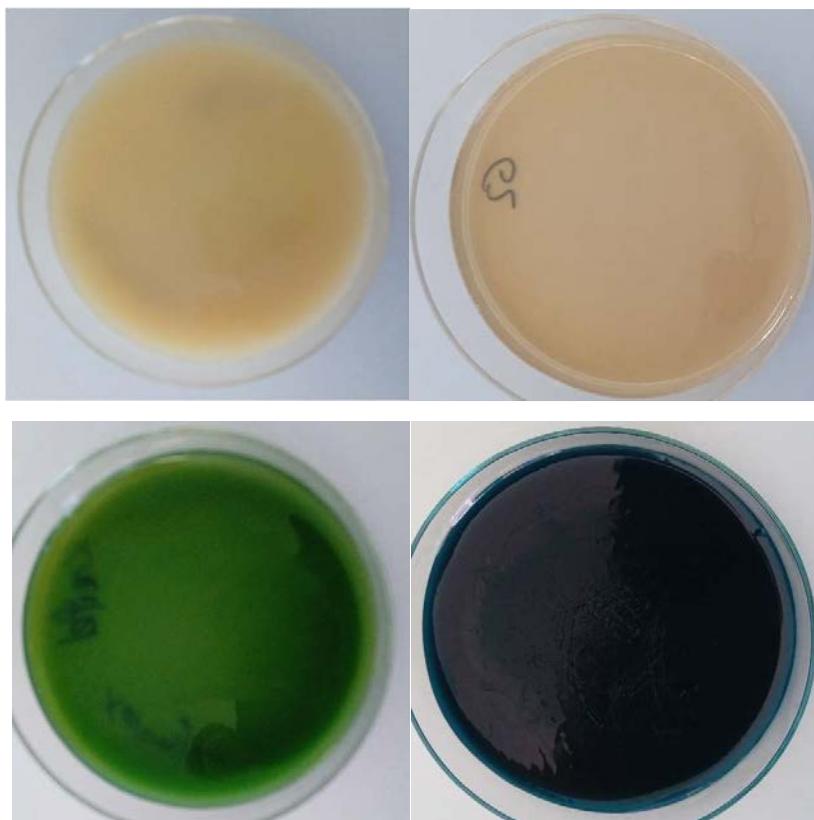


Figura 4. Medios de cultivo sólido recomendados para la detección de bacterias acéticas (GYC, G2, Kneiffel y Wallerstein).

4.1.3. Diseño de un nuevo medio de cultivo

Teniendo en cuenta los resultados del apartado 4.1.2 se procedió al diseño de un nuevo medio que fuera más eficaz. Se diseñaron dos medios de cultivo líquido, denominados A y B, descritos en las Tablas 6 y 7 del capítulo 4.4.1.

Para evaluar su eficacia se utilizó un vino procedente de una bodega que presentaba problemas de cantidades elevadas de ácido acético. Este vino se analizó fisicoquímicamente (apartado 5.3) y mediante qPCR, y también se sembró en los cuatro medios sólidos recomendados para bacterias acéticas citados anteriormente (GYC, G2, Kneifel y Wallwerstein) y en los medios de cultivo líquidos A y B diseñados, añadiendo 1 ml de vino en los medios sólidos y 10 ml de vino en los botes con 20 ml de medio líquido (Figura 5).

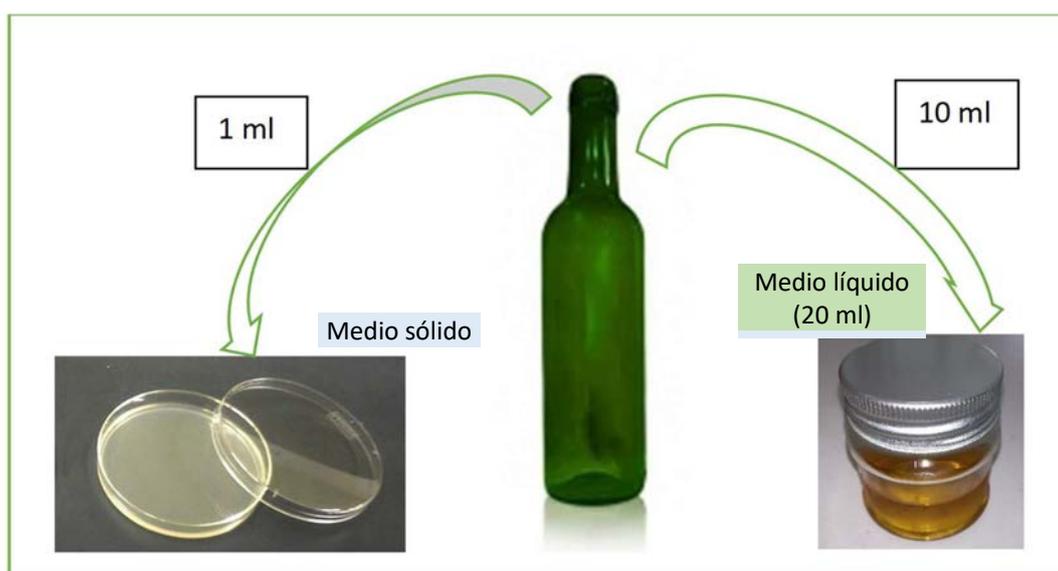


Figura 5. Inoculación de vino en los medios de cultivo sólido y líquido.

Los medios líquidos inoculados se colocaron en una estufa a 30°C, y se dejaron durante un periodo de tiempo de 7 a 14 días, con análisis visuales, olfativos y de ácido acético cada 24-48 horas (Figura 6).

Se realizaron los siguientes análisis:

- Análisis mediante analizador enzimático de la concentración de ácido acético, tomando una alícuota del medio inoculado.
- Análisis visual. Revisión de la presencia de turbidez, precipitados, mohos, o velo, del medio inoculado.
- Análisis olfativos. Cata olfativa del medio inoculado, se centró en el aroma a ácido acético, y se llevo a cabo por personal entrenado en el panel de cata de Laboratorio Dolmar Tentamus.



Figura 6. Análisis visuales, olfativos y de ácido acético para evaluar el medio líquido diseñado.

Posteriormente, se seleccionaron veinticinco vinos con niveles de población de bacterias acéticas diversos a los que se les habían realizado previamente los análisis físico-químicos (Tabla 16, apartado 5.3) y de PCR cuantitativa (Tabla 15, apartado 5.3). Sobre estos vinos se verificó la utilidad del medio comparando los resultados obtenidos en los diferentes análisis.

4.1.4. Estudio de mejoras del medio de cultivo líquido

Tras el diseño del medio, para estudiar su eficacia en la detección de bacterias acéticas, se hicieron pruebas para mejorarlo, principalmente en el aroma. El objetivo era evitar la interferencia de los componentes del medio en la olfacción.

Para ello se diseñaron dos nuevos medios de cultivo (C y D) descritos en las Tablas 8 y 9 del apartado 4.4.1, en los que se sustituyó la peptona y el extracto de levadura por triptona, triptosa y extracto de guisante. Además, se añadió un 2 % de amberlite, una resina de intercambio iónico que permite disminuir el aroma, a cada medio de cultivo, denominando a los medios adicionados como C+R y D+R. Se dejó actuar la amberlite durante 24 horas antes de eliminarla del medio por decantación. Se eligió este compuesto por su eficacia en eliminar los aromas. Las pruebas de verificación se realizaron con el mismo vino empleado en el apartado 4.1.3.

Además, para analizar la eficacia del medio mejorado (D+R) con el medio de partida (B), se analizaron 10 vinos, que también se controlaron mediante PCR (Tabla 20, apartado 5.4) y físico-químicamente (Tabla 21, apartado 5.4).

4.1.5. Estudio de la caducidad y estabilidad del medio de cultivo

Para evaluar la estabilidad del medio B en condiciones de conservación a temperatura ambiente se controlaron 100 botes de medio preparado durante un mes.

Se estudió el uso de inhibidores de crecimiento, tanto de levaduras, bacterias lácticas, como mohos, seleccionados por su uso habitual. También se evaluó la esterilización de los botes de plástico donde se almacenaba el medio, empleando etanol y luz ultravioleta.

En un primer ensayo se añadieron al medio seleccionado en el apartado anterior 100 mg/l de natamicina (pimaricina) para inhibir crecimiento de levaduras y 12,5 mg/l de penicilina para evitar el crecimiento de lactobacterias. Tras esterilizar el medio en autoclave, se distribuyó en una cabina de flujo laminar con luz ultravioleta en botes con 20 ml de medio de cultivo. Estos botes previamente a su llenado se trataron con etanol al 70 % durante 24h.

En un segundo ensayo se añadió al medio de cultivo cristal de violeta (5 microlitros) y sales biliares (0,5 g por litro), que son inhibidores de bacterias Gram +. Después de esterilizar se añadieron 0,04 g/l de cicloheximida y 0,66 g/l de pimaricina.

Finalmente, se estudió la estabilidad del medio conservado a diferentes temperaturas (4-30°C). durante seis meses.

4.1.6. Estudios de sensibilidad del medio de cultivo

Una vez diseñado el medio y las condiciones de conservación, se evaluó su eficacia en la detección de bacterias acéticas. Se partió de un mosto, un vino espumoso, un vino oloroso y un vino tinto, analizados previamente por PCR (Tabla 22, apartado 5.6), contaminado naturalmente con diferentes concentraciones de *A. aceti*, y se comprobó la sensibilidad del medio de cultivo y su respuesta mediante el aumento de la concentración de ácido acético.

Para ello se añadieron 10 ml de mosto/vino en el bote con 20 ml del medio de cultivo, y se procedió a su evaluación olfatométrica y analítica a lo largo del tiempo (15 días).

4.1.7. Estudios de especificidad y capacidad de cuantificación del medio

Para evaluar la capacidad de crecimiento de otros microorganismos productores de ácido acético en el medio diseñado, se inocularon en botes con el medio de cultivo, diferentes microorganismos capaces de generar ácido acético en diferentes concentraciones. El contenido de los botes se analizó a lo largo del tiempo mediante PCR cuantitativa (apartado 5.6) y análisis de ácido acético (Tabla 25, apartado 5.6).

Por otra parte, para estudiar la capacidad de cuantificación del medio de cultivo, éste se sembró con diferentes concentraciones de bacterias acéticas de los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Komagateibacter*. Las cepas, descritas en el apartado 4.5, se adquirieron liofilizadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), se reconstituyeron en el caldo de cultivo recomendado en cada caso y se incubaron a 30°C durante 24 horas. Para conocer la concentración de cada cepa se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en placas Petri con medio de cultivo PCA (ver tabla 3, punto 4.4.1).

Las concentraciones estudiadas de cada microorganismo fueron: *Acetobacter aceti* (10 a 10^7 UFC/ml), *Gluconobacter oxidans* (10^2 a 10^9 UFC/ml) y *Komagataeibacter europaeus* (10^2 a 10^9 UFC/ml).

El medio de cultivo líquido se sembró con 10 ml de cada una de las concentraciones de cada cepa, se incubaron en una estufa a 30°C, y se analizó la concentración de ácido acético cada día.

4.1.8. Pruebas de validación del medio. Interferencias de otros microorganismos

4.1.8.1 Pruebas con microorganismos cultivados en medio de cultivo líquido

Se inocularon cepas de diferentes microorganismos en el medio de cultivo, tanto de manera individual como mezcladas, para estudiar la variación en la concentración de los microorganismos y del ácido acético, durante el tiempo de empleo.

Se emplearon para contaminar microorganismos en concentración de 10^4 UFC/ml de bacterias acéticas (*Acetobacter aceti*, *Acetobacter oeni*, *Gluconobacter oxidans*, *Komagataeibacter europaeus*), lácticas (*Oenococcus oeni*), levaduras (*Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Brettanomyces bruxellensis*), y mohos (*Penicillium funiculosum*). Los microorganismos empleados se describen en el punto 4.5. Las cepas se prepararon a partir de cepas liofilizadas de referencia de la CECT, reconstituidas y cuantificadas tal y como se describe en el punto 4.1.7 para bacterias acéticas. Una vez preparadas se adicionaron al medio y se hizo seguimiento durante 15 días.

4.1.8.2 Pruebas con microorganismos procedentes de vinos contaminados

Finalmente, se realizó un estudio a partir de vinos procedentes de estudios intercomparativos de microorganismos de Bipea, empresa organizadora de ejercicios de intercomparación para laboratorios, acreditada por COFRAC según la norma NF-EN ISO/IEC 17043. Entre dichas muestras de vinos, los hay contaminados con levaduras (*Saccharomyces* y *Brettanomyces*), mohos y bacterias acéticas y lácticas. En nuestro estudio se utilizaron cuatro muestras con los siguientes microorganismos:

- Referencia 6-0279-0022. Muestra con *Lactobacillus rhamnosus* ($2,4 \times 10^3$ UFC/ml) y una concentración de ácido acético de 0.13 mg/l.
- Referencia 16-0179-0031. Muestra con *Dekkera bruxellensis* ($5,6 \times 10^5$ UFC/ml) y una concentración de ácido acético de 0.13 mg/l.
- Referencia 3-0479-0025. Muestra con *Saccharomyces cerevisiae* ($3,5 \times 10^5$ UFC/ml) y *Aspergillus brasiliensis* ($1,8 \times 10^3$ UFC/ml) y una concentración de ácido acético de 0.14 mg/l.
- Referencia 6-0379-0015. Muestra con *Acetobacter aceti* ($3,7 \times 10^5$ UFC/ml) y una concentración de ácido acético de 0.16 mg/l.

Estos vinos con una concentración conocida de microorganismos, se inocularon en el medio y se hizo el seguimiento durante 15 días.

4.1.9. Estudios con diferentes vinos y mostos comerciales

Una vez validado el medio de cultivo, se estudió su efectividad en diferentes muestras de vino de distintos tipos en función de la variedad, la zona de procedencia y la edad.

Se analizaron cuatro mostos y 45 vinos, procedentes de 19 Denominaciones de Origen distintas.

4.1.10. Estudios en diferentes bodegas

Como última etapa del estudio de la idoneidad del medio de cultivo diseñado, se suministró el medio de cultivo líquido a siete bodegas interesadas en su uso, para que hicieran pruebas en el entorno y condiciones reales de utilización. En las cajas con el medio de cultivo se incluyeron dos botes de vidrio con un vino esterilizado en un caso, y el mismo vino contaminado posteriormente con una concentración de 10^4 UFC/ml de *A. aceti*, para que sirvieran de control negativo y positivo respectivamente.

Además de los medios de cultivo, se les proporcionaron instrucciones sobre su empleo y una tabla de interpretación de los resultados (Ver punto 5.8).

Para la toma de datos en las bodegas también se envió una plantilla, donde se solicitaba su evaluación sobre facilidad de uso, eficacia, ...

4.2. Muestras de vinos utilizados en los distintos ensayos realizados

Se analizaron vinos procedentes de muestras analizadas previamente en el laboratorio y de las cuales se conocía si tenían o no bacterias acéticas. Se trataba de vinos procedentes de diferentes denominaciones de origen de España, diferentes variedades de uva, añadas..., muestras cogidas al azar de las que llegan a diario al laboratorio y muestras entregadas en el laboratorio por bodegas que participaban en el desarrollo de esta Tesis.

El uso de estas muestras se distribuyó según los distintos ensayos de la siguiente forma:

- Ensayo 4.1.1. Se emplearon dos vinos tintos con problemas de ácido acético analizados previamente en el laboratorio.
- Ensayo 4.1.2. Se emplearon veinticinco vinos analizados previamente en el laboratorio con poblaciones de *A. aceti* comprendidas entre <10 y $7,9 \times 10^5$ cel/ml.
- Ensayo 4.1.3. Un vino comercial con problemas de ácido acético.
- Ensayo 4.1.4. Diez vinos comerciales analizados previamente.
- Ensayo 4.1.6. Tres vinos y un mosto comerciales.
- Ensayo 4.1.8. Se emplearon 4 vinos procedentes de ensayos de estudios de intercomparación contaminados con diferentes microorganismos.
- Ensayo 4.1.9. Cuatro mostos y cuarenta y cinco vinos comerciales.
- Ensayo 4.1.10. Siete bodegas colaboradoras que emplearon sus propios vinos.

4.3. Análisis físico-químico de los vinos

Todos los métodos empleados en los análisis físico-químicos de los vinos en Laboratorios Dolmar Tentamus están amparados por la acreditación ISO 17025.

- Grado alcohólico

Se empleó la técnica de infrarrojo cercano (NIR) con un software comercial. El método empleado en este caso, relaciona el grado alcohólico con una señal en el espectro de infrarrojos de la matriz a analizar, transformando esa señal en un valor numérico (% vol) que es el grado alcohólico. El equipo empleado fue un Anton Paar AlcoLyzer Wine.

- Sulfuroso libre y total

El procedimiento está basado en el método OIV-MA-AS323-04A1 de dióxido de azufre libre y OIV-MA-AS323-04A2 de dióxido de azufre total, modificados por la Resolución OIV-OENO 591A-2018 (Tipo II) y se fundamenta en que el dióxido de azufre libre es arrastrado por una corriente de aire y es fijado y oxidado por borbotado sobre una solución diluida neutra de peróxido de hidrógeno. El ácido sulfúrico formado se determina por titración con una solución valorada de hidróxido sódico. El dióxido de azufre libre se extrae del vino por arrastre a baja temperatura y el total es extraído del vino por arrastre a alta temperatura.

- Ácido acético

Su análisis se basa en reacciones enzimáticas conforme a resolución OIV/OENO 391/2010. Se empleó un análisis enzimático específico en un analizador automático secuencial, MIURA-200.

- Ácido málico

Su análisis se basa en reacciones enzimáticas conforme al método OIV-MA-AS313-11. Se emplea un análisis enzimático específico en un analizador automático secuencial, MIURA-200.

- Glucosa-Fructosa

Su análisis se basa en reacciones enzimáticas conforme al método OIV-MA-AS311-02. Se emplea un análisis enzimático específico en un analizador automático secuencial, MIURA-200.

- pH y Acidez Total

El análisis del pH de los vinos se realizó con un pHmetro, ATP 3000 de LMG Service Pro. La acidez total de vino se determinó mediante una titulación ácido-base automática. Ambas determinaciones se basan en el método OIV-MA-AS313-01.

4.4. Análisis microbiológicos

4.4.1. Medios de cultivo empleados

Tabla 3. Composición del Medio PCA utilizado para el recuento de microorganismos aerobios.

Nombre medio	PCA
Componentes	Cantidad
Peptona de caseína	5 g
Extracto de levadura	2,5 g
D (+)-Glucosa	1 g
Agar	15 g
Agua (H ₂ O)	Completar hasta 1000 ml

Tabla 4. Composición del Medio GYC utilizado para el recuento de Acetobacterias.

Nombre medio	GYC (recuento de levadura de glucosa)
Componentes	Cantidad
Glucosa	50 g
Extracto de levadura	10 g
Carbonato de calcio (CaCO ₃)	30 g
Agar	25 g
Agua (H ₂ O)	Completar hasta 1000 ml

Agregar 100 mg/l de natamicina (pimaricina) para inhibir crecimiento de levaduras y 12,5 mg/l de penicilina para evitar el crecimiento de lactobacterias.

Tabla 5. Composición del Medio G2 utilizado para el recuento de Acetobacterias.

Nombre medio	G2
Componentes	Cantidad
Extracto de levadura	1,2 g
Fosfato de amonio	2 g
Zumo de manzana	500 ml
Agar	20 g
Agua (H ₂ O)	Completar hasta 1000 ml
pH	5

Agregar 100 mg/l de natamicina (pimaricina) para inhibir crecimiento de levaduras y 12,5 mg/l de penicilina para evitar el crecimiento de lactobacterias.

Tabla 6. Composición del Medio Kneifel utilizado para el recuento de Acetobacterias.

Nombre medio	Kneifel
Componentes	Cantidad
Extracto de levadura	30 g
Etanol	20 ml (Después de autoclave)
Verde de bromocresol 2,2%	1 ml
Agar	20 g
Agua (H ₂ O)	Completar hasta 1000 ml

Agregar 100 mg/l de natamicina (pimaricina) para inhibir crecimiento de levaduras y 12,5 mg/l de penicilina para evitar el crecimiento de lactobacterias.

Tabla 7. Composición del Medio Wallerstein utilizado para el recuento de *Acetobacterias*.

Nombre medio	WL (Wallerstein) diferencial
Componentes	Cantidad
Glucosa	50 g
Peptona	5 g
Extracto de levadura	4 g
Fosfato dihidrógeno potásico (K ₂ HPO ₄)	0,55 g
Cloruro potásico (KCl)	0,425 g
Cloruro cálcico (CaCl ₂)	0,125 g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0,125 g
Cloruro Férrico (FeCl ₃)	0,0025 g
Sulfato de Manganeso (MnSO ₄)	0,0025 g
Verde de bromocresol	0,022 g
Agar bacteriológico	12 g
Agua (H ₂ O)	Completar hasta 1000 ml
pH	5,5
Cicloheximida	4 mg/l

Sustituir el 20% de agua por vino filtrado estéril para mejorar el crecimiento.

Tabla 8. Composición del Medio A utilizado para la semicuantificación de bacterias acéticas.

Nombre medio	A
Componentes	Cantidad
Extracto de levadura	5 g
Peptona	5 g
Glucosa	5 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1 g
Agua (H ₂ O)	Completar hasta 1000 ml

Agregar después de esterilizar 0,3 ml de natamicina (pimaricina) (de concentración 0,66 g/l).

Tabla 9. Composición del Medio B utilizado para la semicuantificación de bacterias acéticas.

Nombre medio	B
Componentes	Cantidad
Extracto de levadura	4 g
Peptona	5 g
Glucosa	50 g
H ₂ PO ₄	0,55 g
CaCl ₂	0,125 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,125 g
MnSO ₄	0,0025 g
Agua (H ₂ O)	Completar hasta 1000 ml

Agregar después de esterilizar 0,3 ml de natamicina (pimaricina) (de concentración 0,66 g/l).

Tabla 10. Composición del Medio C utilizado para la semicuantificación de bacterias acéticas.

Nombre medio	C
Componentes	Cantidad
Extracto de guisante	4 g
Triptona	5 g
Glucosa	5 g
H ₂ PO ₄	0,55 g
CaCl ₂	0,125 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,125 g
MnSO ₄	0,0025 g
Agua (H ₂ O)	Completar hasta 1000 ml

Agregar después de esterilizar 0,3 ml de natamicina (pimaricina) (de concentración 0,66 g/l).

Tabla 11. Composición del Medio D utilizado para la semicuantificación de bacterias acéticas.

Nombre medio	D
Componentes	Cantidad
Triptosa	5 g
Triptona	5 g
Glucosa	5 g
H ₂ PO ₄	0,55 g
CaCl ₂	0,125 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,125 g
MnSO ₄	0,0025 g
Agua (H ₂ O)	Completar hasta 1000 ml

Agregar después de esterilizar 0,3 ml de natamicina (pimaricina) (de concentración 0,66 g/l).

Tabla 12. Composición del Medio de cultivo líquido Final utilizado para la semicuantificación de bacterias acéticas.

Nombre medio	FINAL
Componentes	Cantidad
Extracto de levadura	4 g
Peptona	5 g
Glucosa	50 g
H ₂ PO ₄	0,55 g
CaCl ₂	0,125 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,125 g
MnSO ₄	0,0025 g
Agua (H ₂ O)	Completar hasta 1000 ml

Agregar antes de esterilizar 0,5 g de sales biliares y 5 microlitros de cristal de violeta.

Agregar después de esterilizar 0,3 ml de natamicina (pimaricina) (de concentración 0,66 g/l) y 0,04 g de cicloheximida.

4.4.2. Cepas de microorganismos utilizadas

Las referencias de las cepas de microorganismos empleadas en los distintos ensayos se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Cepas de microorganismos utilizados y referencias.

NOMBRE CEPA	ATCC
<i>Acetobacter aceti</i>	CECT 298
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CECT 1182
<i>Pichia membranifaciens</i>	CECT 1115
<i>Gluconobacter oxidans</i>	CECT 4009
<i>Komagataeibacter europaeus</i>	CECT7583
<i>Penicillium funiculosum</i>	CECT 2914
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	CECT 14517
<i>Oenococcus oeni</i>	CECT 217

4.4.3. qPCR (PCR cuantitativa en tiempo real)

Se han usado kits comerciales Scorpions de la empresa Vivalys (Domaine du Chapitre, 170 boulevard du Chapitre, 34750 Villeneuve-lès-Maguelone), que permiten llevar a cabo la extracción de ADN, y el uso de sondas específicas para cada grupo de microorganismos analizado en el vino.

El termociclador empleado para la qPCR fue el SmartCycler de Cepheid (Sunnyvale, California USA)⁷⁴.

En el análisis mediante qPCR de los vinos, se estudiaron distintos grupos de microorganismos, agrupados según los primers disponibles en el kit Scorpions: el grupo de bacterias 1 (*Acetobacter: Acetobacter aceti, A. pasterianus, A. cerevisiae, Gluconobacter oxydans, G. hansenii, G. liquefaciens*), el grupo de bacterias 2 (*Oenococcus oeni y Pediococcus: Pediococcus parvulus, P. damnosus, P. inopinatus, P. pentosaceus, P.*

⁷⁴ www.cepheid.com

acidilactici), el grupo de bacterias 3 (*Lactobacillus*: *L. brevis*, *L. plantarum* y *L. kunkeii*) y un grupo de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Zygosacchamomyces*: *Z. bailii* y *Z. bisporus*).

El protocolo seguido fue el siguiente:

- Preparación de la muestra: Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de la solución de lavado, y se volvió a centrifugar.
- Lisis celular: se añadieron 100 µl de mezcla enzimática al pellet y el conjunto se homogeneizó e incubó a 37°C durante 40 minutos, agitando cada 10 minutos. Posteriormente se añadieron 100 µl de solución de lisis (proteinasas K), y el conjunto se incubó a 70°C durante 10 minutos. Más tarde, los eppendorf se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 segundos, y se recogió el sobrenadante.
- Extracción de ADN: se añadieron 200 µl de etanol al sobrenadante, se mezclaron y se centrifugaron a 12000 rpm durante 1 minuto en un tubo colector. Más tarde, el tubo se lavó con las soluciones disponibles en el kit. El tubo se secó y el ADN se diluyó añadiendo 50 µl de solución de elución a 70°C, se dejó 1 minuto a temperatura ambiente, y se repitió todo el proceso. Finalmente se centrifugó 1 minuto a 12.500 rpm, y se recogió el extracto.
- Preparación de las reacciones: En cada tubo de PCR, se añadieron 10 µl de medio de reacción, 5 µl de sondas, 4,7 µl de agua, 0,3 µl de sondas de patrón interno y 5 µl de extracto de ADN.
- Programa de amplificación: desnaturalización a 95°C durante 30 s, y amplificación durante 40 ciclos (93°C - 10s, 60°C - 35s). El fluoróforo utilizado para la cuantificación de bacterias acéticas fue FAM (λ 495 / 520 nm).

Las rectas de calibrado para cada uno de los microorganismos estudiados se llevaron a cabo partiendo de cada una de las cepas puras suministradas por el fabricante del termociclador (Cepheid), reconstituyéndolas y haciendo diluciones seriadas 1/10. Cada punto de la recta se obtuvo tratando cada dilución de igual forma que la indicada para las muestras.

RESULTADOS

Y

DISCUSIÓN



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Secuenciación masiva de vinos alterados

Debido a que muchas bodegas habían informado de aumentos repentinos de la acidez volátil en vinos cuya siembra en medios de cultivo para detectar bacterias acéticas había dado resultados negativos, iniciamos este trabajo con la hipótesis de partida de identificar “otros” microorganismos no habituales en vinos, y poder relacionarlos con la alteración. Por ello se decidió emplear la secuenciación masiva para identificar los diferentes microorganismos presentes en vinos que cumplieran las condiciones indicadas anteriormente: aumento de la acidez volátil y resultados negativos al sembrarlos en placas Petri con medio de cultivo específico de bacterias acéticas.

Para una prueba inicial con esta técnica, se eligieron dos vinos tintos que habían sufrido un aumento de su acidez volátil (>1,5 g/l) y cuyo análisis de la población microbiana viable y cultivable había dado resultados negativos. Los resultados obtenidos se publicaron en La semana vitivinícola⁷⁵.

En el vino 1 las especies detectadas mayoritariamente fueron *Pedicoccus parvulus* (44%), *Acetobacter pasteurianus* (16%) y *Bacillus velezensis* (3,57%). El 26,99% de los microorganismos presentes en la muestra se clasificaron como especies minoritarias con una representación menor al 1% (Figura 7).

⁷⁵ Parra, A., Escribano-Viana, R., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R., González-Arenzana, L. Diversidad microbiana de vinos tintos deteriorados durante su conservación. La Semana Vitivinícola. 3563 (2020) 356-360. ISSN 0037-184x

Respecto a la muestra de vino 2, la especie *Chtoniobacter flavus* representó un 4,21% y la especie *Streptomyces adustus* un 3,92% del total de especies identificadas, aunque un 85,45% de las mismas fueron minoritarias. Entre los géneros minoritarios, se detectaron, por ejemplo, *Enterococcus* y *Staphylococcus*. La única especie bacteriana detectada en las dos muestras fue *Streptomyces adustus* con porcentajes variables entre 1,76 y 3,92% según la muestra de vino analizada (Figura 7).

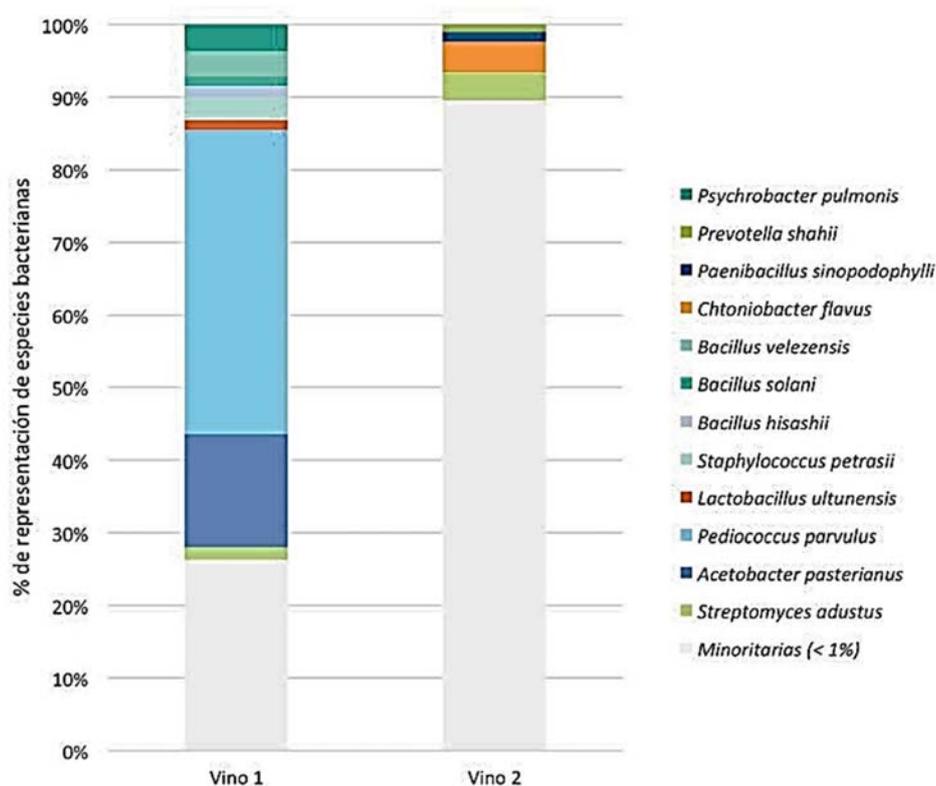


Figura 7. Porcentajes de representación de especies bacterianas (vinos 1 y 2).

Los resultados anteriores indicarían que en la muestra de vino 1 la presencia como especie mayoritaria de *Pediococcus parvulus*, podría estar involucrada en la acetificación de ese vino⁷⁶. A pesar de que algunas bacterias lácticas⁷⁷, están implicadas en el picado del vino, esto suele ocurrir en etapas anteriores a la fermentación maloláctica, ya que pueden metabolizar el ácido cítrico aumentando la acidez volátil.

⁷⁶ Wade, M. E.; Strickland, M. T.; Osborne, J. P.; Edwards, C. G. Role of *Pediococcus* in Winemaking. Australian Journal Grape Wine Res 2018. DOI 10.1111/ajgw.12366

⁷⁷ Gil-Sánchez, I.; Suáldea, B. B.; Moreno-Arribas, M. V. Chapter 6 -Malolactic Fermentation. In Red Wine Technology; Morata, A., Ed.; Academic Press,2019; pp.85–98. DOI 10.1016/B9 78-0-12-814399-5.00006-2

Sin embargo, no es habitual que causen el picado del vino durante su conservación, ya que el ácido cítrico se encuentra en concentraciones residuales. Por lo que resulta más probable que la presencia de *Acetobacter pasteurianus* en el vino en un porcentaje importante, estuviera más implicada en el aumento de la acidez volátil de ese vino, ya que esta especie de bacteria acética es una de las empleadas en la elaboración de vinagre de vino⁷⁸. La especie *Bacillus velezensis* también fue detectada en el vino 1, pero su papel enológico se desconoce.

Respecto a la muestra de vino 2 cabe destacar la amplia diversidad bacteriana presente, que estuvo representada por un importante porcentaje de especies y géneros minoritarios. Entre los géneros detectados, con porcentajes mayores del 1%, estaban *Chthonibacter*, *Prevotella* y *Paenibacillus*, de los que también se desconoce su función enológica.

La única especie detectada en los dos vinos fue *Streptomyces adustus*. De forma general, el género *Streptomyces* ha sido una fuente importante de antibióticos naturales y precisamente esta circunstancia fue la que llevó a algunos autores a emplearlo como “microorganismo control” de microorganismos perjudiciales para la calidad organoléptica de los vinos⁷⁹. Sin embargo, no existen referencias bibliográficas que demuestren su presencia natural en entornos enológicos.

Cabe reseñar que la mayoría de las especies detectadas son totalmente desconocidas en el ámbito de la microbiología enológica. Hay autores que han empezado a considerar la presencia de este tipo de géneros y especies (*Enterococcus* [10⁸⁰, *Staphylococcus*, etc.) como una amenaza por su potencialidad en la síntesis de aminos biógenas, por lo que no se debe descartar su implicación en los diferentes cambios físico químicos que experimenta el vino durante su conservación.

Los resultados obtenidos indicaron que son necesarios más estudios en esta línea para llegar a conclusiones significativas y sólidas. Pero debido al sentido práctico que se le quería dar a este trabajo, y sobre todo pensando en resultados y métodos de detección que resultasen útiles para las bodegas, se reorientó esta tesis hacia el diseño de nuevos medios de cultivo más adecuados para la detección de bacterias acéticas que los disponibles hasta el momento.

⁷⁸ Hidalgo, C.; Vegas, C.; Mateo, E.; Tesfaye, W.; Cerezo, A. B.; Callejón, R. M.; Poblet, M.; Guillamón, J. M.; Mas, A.; Torija, M. J. Effect of Barrel Design and the Inoculation of *Acetobacter Pasteurianus* in Wine Vinegar Production. *Int J Food Microbiol* 2010, 141 (1–2), 56–62. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.018

⁷⁹ Blättel, V.; Wirth, K.; Claus, H.; Schlott, B.; Pfeiffer, P.; König, H. A. Lytic Enzyme Cocktail from *Streptomyces* Sp. B578 for the Control of Lactic and Acetic Acid Bacteria in Wine. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009, 83 (5), 839–848. DOI 10.1007/s00253-009-1926-7

⁸⁰ Pérez-Martín, F.; Seseña, S.; Izquierdo, P. M.; Palop, M. L. Are *Enterococcus* Populations Present during Malolactic Fermentation of Red Wine Safe? *Food Microbiol* 2014, 42 (0), 95–101. DOI 10.1016/j.fm.2014.03.001

5.2. Análisis de la eficacia de los medios de cultivo en la detección de bacterias acéticas

Para verificar la eficacia de los medios de cultivo disponibles en la detección de bacterias acéticas, se analizaron 25 vinos por qPCR y también se sembraron en los tres medios de cultivo sugeridos por la OIV (GYC, G2 y Kneifel) y en el medio Wallerstein (Wall). Los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Población de bacterias acéticas presentes en 25 vinos analizados por qPCR, y presencia/ausencia de crecimiento de las mismas en los medios de cultivo estudiados.

MUESTRA	Región	Variedad y/o	q-PCR (cel/ml)	Medio	Medio	Medio	Medio
		Tipo de vino	Bacterias acéticas	GYC	G2	Kneifel	Wall
VINO 1	Rioja	Tempranillo Tinto	2.4×10^4	No	No	No	Sí
VINO 2	Rioja	Garnacha Tinto	2.7×10^3	No	No	No	Sí
VINO 3	Rioja	Graciano Tinto	3.7×10^4	No	No	No	Sí
VINO 4	Rioja	Tempranillo Blanco	1.2×10^1	No	No	No	No
VINO 5	Rioja	Viura Blanco	4.8×10^2	No	No	No	No
VINO 6	Ribera Duero	Tempranillo Tinto	7.9×10^5	Sí	Sí	Sí	Sí
VINO 7	Ribera Duero	Tempranillo Tinto	4.1×10^4	No	No	No	Sí
VINO 8	Ribera Duero	Tempranillo Tinto	6.9×10^3	No	No	No	Sí
VINO 9	Ribera Duero	Tempranillo Tinto	1.4×10^3	No	No	No	Sí
VINO 10	Rueda	Verdejo Blanco	<10	No	No	No	No
VINO 11	Valencia	Bobal Tinto	5.1×10^4	No	No	Sí	Sí
VINO 12	Valencia	Merlot Tinto	7.1×10^3	No	No	No	Sí
VINO 13	Extremadura	Syrah Tinto	5.5×10^4	Sí	No	No	Sí
VINO 14	Extremadura	Malbec Tinto	1.8×10^3	No	No	No	No
VINO 15	Cádiz	Palomino Blanco	9.6×10^2	No	No	No	Sí

VINO 16	Cádiz	Palomino Blanco	5.4×10^3	No	No	No	Sí
VINO 17	Cádiz	Pedro Ximénez Blanco	4.8×10^3	No	No	No	Sí
VINO 18	Priorat	Garnacha Tinto	3.6×10^4	No	No	No	Sí
VINO 19	Priorat	Cabernet Sauvignon Tinto	3.9×10^5	Sí	Sí	Sí	Sí
VINO 20	Navarra	Garnacha Rosado	4.6×10^3	No	No	No	Sí
VINO 21	Navarra	Garnacha Rosado	8.1×10^3	No	No	No	Sí
VINO 22	Rías Baixas	Albariño	2.4×10^2	No	No	No	No
VINO 23	Rías Baixas	Treixadura	3.1×10^3	No	No	No	No
VINO 24	Rías Baixas	Albariño	3.5×10^3	No	No	No	Sí
VINO 25	Rías Baixas	Godello	9.1×10^1	No	No	No	No

Los vinos estudiados por qPCR presentaron poblaciones de bacterias acéticas que iban desde $7,9 \times 10^5$ a <10 cel/ml (Tabla 14). Sin embargo, los resultados obtenidos con los medios de cultivo recomendados por la OIV fueron en general negativos, ya que solo se observó crecimiento en las placas cuando la concentración de bacterias acéticas fue superior a 10^5 cel/ml. Sin embargo, se encontró una mayor sensibilidad con el medio Wallerstein, en el que se observó crecimiento a partir de 9.6×10^2 cel/ml.

Estos resultados demostraron que el análisis de la concentración de bacterias acéticas en medios de cultivo tradicionales se podía mejorar, debido a su baja sensibilidad.

5.3. Diseño de un nuevo medio de cultivo

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se consideró que era necesario desarrollar un método de análisis (medio de cultivo) nuevo para poder controlar la concentración de microorganismos capaces de generar ácido acético en bodega. Previamente se había detectado que cada vez más bodegas tenían problemas de aumento en la concentración de ácido acético durante la conservación de sus vinos, y que los controles microbiológicos que se hacían no eran capaces de detectar el riesgo.

Como punto de partida se consideró adecuado el diseño de un método olfatométrico⁸¹, ya que el uso de la olfacción de un medio líquido como detector había sido descrito en la bibliografía por Couto et al. (2005) para el estudio de *Brettanomyces* en vino. La facilidad de uso de ese medio, su demanda por las

⁸¹ J.A.Couto, A.Barbosa and T.Hogg. A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines. *Letters in Applied Microbiology*, 2005, 41, 505-510 doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01782.x

bodegas, y la fácil detección organoléptica del ácido acético, hizo que esa fuera la opción elegida para el desarrollo del nuevo medio.

El estudio de la bibliografía referente a medios de cultivo líquidos para bacterias acéticas no dio como resultado referencias específicas, como si las hay para medios sobre *Brettanomyces*. Por ello, se tomaron dos referencias de un medio de cultivo líquido para *Brettanomyces*^{63,82} que sirvieron de base para el desarrollo del medio estudiado en este trabajo. Si que se encontraron referencias a medios de enriquecimiento para bacterias acéticas, incluyendo referencias a bacterias viables pero no cultivables, y como en estos medios éstas se pueden desarrollar⁸³.

Por ello, partiendo del medio Wallerstein en forma líquida, sin agar (para pasar de medio sólido a líquido) y sin verde de bromocresol (no es necesaria la coloración), se realizaron variaciones en su composición para incrementar su sensibilidad. También se tuvieron en cuenta las características que permiten el desarrollo óptimo de bacterias acéticas en vinagres para obtener la mayor cantidad de ácido acético en el menor tiempo posible (Melo, 2016)⁸³, y la experiencia previa analizando *Brettanomyces* con medios de cultivo líquidos por olfatometría (Rodrigues et al., 2001⁸² y Couto et al., 2005⁸¹). Se prepararon inicialmente dos medios (A y B) modificando la cantidad de oligoelementos, eliminando en el medio A: KCl, CaCl₂, FeCl₃, y MnSO₄, y en el medio B: tan solo KCl y FeCl₃. En este ensayo ambos medios se prepararon con agua estéril y también sustituyendo el agua por vino previamente filtrado y esterilizado. También se consideró la adición de etanol al medio de cultivo (0, 1, 2 y 4 %), ya que el alcohol es uno de los compuestos que las bacterias acéticas transforman en ácido acético.

Para probar la eficacia de dichos medios, se analizó la población de bacterias acéticas en un vino tinto de la variedad Tempranillo, cosecha 2017, que presentó un elevado contenido de ácido acético (Tabla 15). Este vino se sembró en los medios sólidos probados anteriormente y también en los medios líquidos A y B, y también fue analizado mediante qPCR. El análisis por qPCR dio como resultado una población de bacterias acéticas de $1,6 \times 10^5$ cel/ml (Tabla 16). Sin embargo, con los medios GYC, G2 y Kneifel la población fue inferior a 10 UFC/ml; y con el medio Wallerstein se obtuvo un recuento muy bajo, de 1×10^2 UFC/ml (Tabla 16), lo que demuestra nuevamente la escasa eficacia de los medios sólidos en la detección de bacterias acéticas.

⁸² Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology*. 90 (2001) 588-599. DOI 10.1046/j.1365-2672.2001.01275.x

⁸³ Melo, J. Microbiology of Vinegar: from Isolation, Phenetic Characterization and Detection of Acetic Acid Bacteria to Microbial Profiling of an Industrial Production. Master Microbiología. (2016). Instituto Superior Técnico Lisboa

Tabla 15. *Análisis físico-químico del vino Tempranillo (2017)*

ANÁLISIS	RESULTADO
Grado alcohólico adquirido, %	12,50
pH	3,61
Acidez total tartárica, g/l	5,64
Ácido acético, g/l	1,12
Ácido L-málico, g/l	< 0,20
Glucosa-Fructosa, g/l	< 0,20
Sulfuroso libre, mg/l	16

Tabla 16. *Población de Bacterias acéticas presentes en el vino Tempranillo (2017) analizada mediante q-PCR y mediante siembra en diferentes medios de cultivo sólidos.*

ANÁLISIS	Población de bacterias acéticas
q-PCR, cel/ml	$1,6 \times 10^5$
Medio GYC, UFC/ml	< 10
Medio G2, UFC/ml	< 10
Medio Kneifel, UFC/ml	< 10
Medio Wallerstein, UFC/ml	1×10^2

Los resultados obtenidos, tanto en la evolución del ácido acético como en el análisis olfatométrico al sembrar el vino en los medios diseñados A y B se muestran en la Tabla 17. Se puede observar la generación de ácido acético, cuya concentración fue aumentando con el paso del tiempo, y que fue apreciable por el olfato humano desde los días 2-3 de la siembra del vino y se mantuvo hasta el día 6.

Los mejores resultados de detección precoz por olfacción se obtuvieron con el medio B, alcanzando el umbral de percepción del ácido acético (0,7 g/l)⁸⁴ el día 2.

El empleo de agua o vino como base para preparar el medio de cultivo no fue relevante en el tiempo de detección del ácido acético por olfacción, a pesar de que el empleo de vino incrementó el nivel de ácido acético de partida, lo que podría haber favorecido alcanzar antes el umbral de detección. Por ello, se decidió preparar el medio con base agua porque es más sencillo y permite estandarizar el medio diseñado.

En general, la adición de etanol al medio empeoró los resultados. En el medio A el aumento de la concentración de ácido acético fue más rápido y mayor cuando al medio no se le adicionó etanol, independientemente de la base. Sin embargo, en el medio B cuando la base del medio fue agua, la adición de mayores cantidades de etanol, 2 y 4%, aumentaron la producción de acético y su detección. Sin embargo, cuando la base fue vino, la adición de etanol retrasó la detección.

⁸⁴ Etievant, P. Volatile Compounds in Food and Beverage. Maarse, H. 14 (1991) 483–533. DOI 10.1201/9780203734285

Tabla 17. Evolución de la concentración de ácido acético y su detección aromática en los medios A y B inoculados con un vino con una población de bacterias acéticas de 10^5 cel/ml. El sombreado en rojo indica el momento en el que se detectó el olor a ácido acético.

MEDIO	ETANOL %	Día 0		DIA 2		DIA 3		DIA 6	
		Ácido acético	Ácido acético	OLFACCIÓN	Ácido acético	OLFACCIÓN	Ácido acético	OLFACCIÓN	
A (Agua)	0		0,44	NO	1,1	Sí	1,7	Sí	
	1	0,3	0,37	NO	0,81	Sí	1,3	Sí	
	2		0,36	NO	0,64		1,1	Sí	
	4		0,35	NO	0,43		0,95	Sí	
A (Vino)	0			0,52	NO	1,07	Sí	1,55	Sí
	1	0,42	0,49	NO	0,74	Sí	1,2	Sí	
	2		0,5	NO	0,92	Sí	1,3	Sí	
	4		0,49	NO	0,55		1	Sí	
B (Agua)	0			0,53	NO	1,08	Sí	1,5	Sí
	1	0,4	0,51	NO	1,01	Sí	1,5	Sí	
	2		0,8	Sí	1,29	Sí	1,75	Sí	
	4		0,73	Sí	1,2	Sí	1,6	Sí	
B (Vino)	0			0,89	Sí	1,65	Sí	2,25	Sí
	1	0,55	0,7	Sí	1,22	Sí	1,6	Sí	
	2		0,64	NO	1,18	Sí	1,65	Sí	
	4		0,58	NO	0,65	NO	1,05	Sí	

Para continuar con la evaluación de los medios A y B con base agua, se analizó su capacidad de detección con los 25 vinos caracterizados previamente en los medios de cultivo sólidos disponibles en el mercado.

En la Tabla 18 se muestra la composición físico-química inicial de los 25 vinos, en la Tabla 19 los resultados obtenidos mediante qPCR de los microorganismos analizados, y en la Tabla 20 los resultados obtenidos al sembrar dichos vinos en los medios A y B.

Respecto a la composición físico-química de los vinos (Tabla 18) se pudo observar que la concentración de etanol, grado alcohólico, y el pH, no tuvieron mucha influencia en el crecimiento de bacterias acéticas en el medio de cultivo (Tabla 20), probablemente porque las características del medio y la dilución del vino en el mismo, disminuyeron su influencia. Así, en los vinos 23 y 24 que tenían un grado en torno al 13% y un pH cercano a 3, con una concentración de *A. aceti* de 10^3 cel/ml, dieron positivo por olfacción el quinto día de encubado. El contenido inicial de ácido acético (Tabla 18) en principio no influye en el momento en el que aparece el aroma en el medio de cultivo, ya que las muestras de vino se diluyen a un tercio (10 ml de vino en 20 ml de medio de cultivo), y el aumento posterior de la concentración de acético es debida a la presencia de bacterias. Los vinos 2, 8, 9, 12, 14 y 17, presentaron una concentración de bacterias similar a los anteriores y también dieron positivo el día 5, pero, sin embargo, presentaban un grado alcohólico del 14% y un pH cercano a 3,8, a excepción del vino 17 que tenía un pH cercano a 3.

Sin embargo, la población de bacterias acéticas presentes en el vino (Tabla 19) si influyó en el tiempo que tardó en desarrollarse el ácido acético (Tabla 20). Este es un aspecto que se estudiará más adelante con más detalle.

En relación a la presencia de otros microorganismos (Tabla 19), no se detectó en ninguno de los vinos *Zygosaccharomyces* spp. y muy pocas *Saccharomyces* spp. Pero si se observó que cuanto mayor fue la presencia de *Acetobacter*, fue también mayor la presencia de *Oenococcus* spp. y de *Pediococcus* spp., microorganismos que también son capaces de producir ácido acético. Esta presencia de otros microorganismos en los 25 vinos estudiados podría cuestionar que fueran las bacterias acéticas las únicas responsables del aumento del ácido acético en el medio de cultivo. En el punto 5.7 se estudiará con mayor profundidad la interacción entre los diferentes microorganismos y su crecimiento en el medio de cultivo.

Tabla 18. Composición físico-química de los 25 vinos estudiados.

MUESTRA	Región	Variedad y/o tipo	Grado Alcohólico	pH	Acidez Total	Ácido Acético	Ácido L-málico	Glucosa-fructosa	Sulfuroso libre
			(%)		(g tartárico/l)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(mg/l)
VINO 1	Rioja	Tempranillo Tinto	14.53	3.71	5.03	0.69	<0.20	<0.20	29
VINO 2	Rioja	Garnacha Tinto	14.07	3.74	4.78	0.54	<0.20	<0.20	27
VINO 3	Rioja	Graciano Tinto	14.25	3.70	4.82	0.58	<0.20	0.23	32
VINO 4	Rioja	Tempranillo Blanco	13.11	3.29	5.96	0.23	2.98	<0.20	24
VINO 5	Rioja	Viura Blanco	12.98	3.31	6.01	0.45	2.59	0.21	26
VINO 6	Ribera Duero	Tempranillo Tinto	13.91	3.87	5.13	0.87	<0.20	0.32	31
VINO 7	Ribera Duero	Tempranillo Tinto	14.12	3.78	4.89	0.74	<0.20	<0.20	28
VINO 8	Ribera Duero	Tempranillo Tinto	14.27	3.82	5.01	0.50	<0.20	<0.20	29
VINO 9	Ribera Duero	Tempranillo Tinto	14.22	3.91	4.96	0.56	<0.20	0.28	27
VINO 10	Rueda	Verdejo Blanco	12.89	3.22	5.89	0.19	3.01	0.34	23
VINO 11	Valencia	Bobal Tinto	15.01	3.85	5.12	0.65	<0.20	<0.20	31
VINO 12	Valencia	Merlot Tinto	14.59	3.84	4.82	0.48	<0.20	<0.20	35
VINO 13	Extremadura	Syrah Tinto	14.13	3.79	4.69	0.63	<0.20	<0.20	34
VINO 14	Extremadura	Malbec Tinto	14.36	3.88	4.71	0.61	<0.20	<0.20	36
VINO 15	Cádiz	Palomino Blanco	15.05	3.29	5.68	0.37	2.59	0.22	30
VINO 16	Cádiz	Palomino Blanco	14.97	3.35	5.87	0.39	2.78	0.34	29
VINO 17	Cádiz	Pedro Ximénez Blanco	17.13	3.37	5.79	0.45	2.57	>20.00	37
VINO 18	Priorat	Garnacha Tinto	14.62	3.76	5.13	0.74	<0.20	<0.20	31
VINO 19	Priorat	Cabernet Sauvignon Tinto	14.47	3.84	4.84	0.71	<0.20	0.27	32
VINO 20	Navarra	Garnacha Rosado	13.15	3.69	5.36	0.54	1.59	<0.20	25
VINO 21	Navarra	Garnacha Rosado	13.47	3.72	5.37	0.60	1.57	<0.20	28
VINO 22	Rías Baixas	Albariño	13.15	3.15	6.21	0.39	2.74	<0.20	29
VINO 23	Rías Baixas	Treixadura	13.26	3.17	6.27	0.35	2.89	<0.20	24
VINO 24	Rías Baixas	Albariño	12.78	3.28	6.13	0.43	3.01	<0.20	29
VINO 25	Rías Baixas	Godello	13.05	3.13	6.07	0.25	2.57	<0.20	32

Tabla 19. Población de distintos géneros de levaduras y bacterias (cel/ml) determinada mediante qPCR de los 25 vinos del estudio.

MUESTRA	<i>Acetobacter</i>	<i>Oenococcus.</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>
VINO 1	2.4 x 10 ⁴	1.3 x 10 ²	6.4 x 10 ²	< 10	< 10
VINO 2	2.7 x 10 ³	4.9 x 10 ¹	< 10	< 10	< 10
VINO 3	3.7 x 10 ⁴	< 10	1.6 x 10 ²	1.8 x 10 ²	< 10
VINO 4	1.2 x 10 ¹	< 10	< 10	< 10	< 10
VINO 5	4.8 x 10 ²	7.4 x 10 ¹	< 10	< 10	< 10
VINO 6	7.9 x 10 ⁵	1.6 x 10 ²	8.7 x 10 ¹	< 10	< 10
VINO 7	4.1 x 10 ⁴	< 10	5.6 x 10 ²	5.7 x 10 ²	< 10
VINO 8	6.9 x 10 ³	3.2 x 10 ¹	< 10	< 10	< 10
VINO 9	1.4 x 10 ³	1.3 x 10 ²	< 10	< 10	< 10
VINO 10	<10	< 10	< 10	< 10	< 10
VINO 11	5.1 x 10 ⁴	2.6 x 10 ²	1.9 x 10 ²	4.3 x 10 ³	< 10
VINO 12	7.1 x 10 ³	< 10	< 10	< 10	< 10
VINO 13	5.5 x 10 ⁴	5.1 x 10 ²	4.3 x 10 ²	2.4 x 10 ²	< 10
VINO 14	1.8 x 10 ³	< 10	< 10	< 10	< 10
VINO 15	9.6 x 10 ²	1.7 x 10 ¹	< 10	< 10	< 10
VINO 16	5.4 x 10 ³	4.2 x 10 ¹	< 10	< 10	< 10
VINO 17	4.8 x 10 ³	< 10	< 10	< 10	< 10
VINO 18	3.6 x 10 ⁴	2.5 x 10 ²	9.7 x 10 ¹	< 10	< 10
VINO 19	3.9 x 10 ⁵	< 10	< 10	< 10	< 10
VINO 20	4.6 x 10 ³	6.5 x 10 ¹	6.9 x 10 ²	1.9 x 10 ²	< 10
VINO 21	8.1 x 10 ³	3.2 x 10 ¹	< 10	< 10	< 10
VINO 22	2.4 x 10 ²	1.9 x 10 ²	< 10	< 10	< 10
VINO 23	3.1 x 10 ³	2.1 x 10 ¹	< 10	< 10	< 10
VINO 24	3.5 x 10 ³	< 10	< 10	< 10	< 10
VINO 25	9.1 x 10 ¹	< 10	< 10	< 10	< 10

Tabla 20. Evolución de la concentración de ácido acético y su detección aromática en los medios A y B inoculados con los 25 vinos del estudio. El sombreado en rojo indica el momento en el que se detectó el olor a ácido acético. HAcO: Ácido acético

MUESTRA	Bacterias acéticas cel/ml	MEDIO	DIA 1		DIA 2		DIA 3		DIA 4		DIA 5		DIA 6		DIA 7		DIA 8		DIA 14		
			HAcO	OLFACCIÓN	HAcO	OLFACCIÓN	HAcO														
VINO 1	2.4 x 10 ⁴	A	0.26		0.31	NO	0.37	NO	0.69	NO	0.98	SI									
		B	0.26		0.30	NO	0.39	NO	0.73	SI	1.10	SI									
VINO 2	2.7 x 10 ³	A	0.19		0.23	NO	0.37	NO	0.58	NO	0.95	SI									
		B	0.19		0.24	NO	0.40	NO	0.64	NO	1.02	SI									
VINO 3	3.7 x 10 ⁴	A	0.22		0.31	NO	0.47	NO	0.71	NO	0.99	SI									
		B	0.22		0.35	NO	0.49	NO	0.70	NO	1.05	SI									
VINO 4	1.2 x 10 ¹	A	0.08		0.10	NO	0.10	NO	0.10	NO	0.11	NO	0.27	NO	0.57	NO	0.87	SI			
		B	0.08		0.10	NO	0.11	NO	0.13	NO	0.12	NO	0.36	NO	0.60	NO	0.89	SI			
VINO 5	4.8 x 10 ²	A	0.16		0.15	NO	0.17	NO	0.35	NO	0.58	NO	0.97	SI							
		B	0.16		0.16	NO	0.17	NO	0.42	NO	0.63	NO	1.05	SI							
VINO 6	7.9 x 10 ⁵	A	0.30		0.35	NO	0.47	NO	0.74	SI	1.12	SI									
		B	0.30		0.36	NO	0.52	NO	0.81	SI	1.24	SI									
VINO 7	4.1 x 10 ⁴	A	0.27		0.38	NO	0.52	NO	0.69	NO	0.91	SI									
		B	0.27		0.35	NO	0.57	NO	0.72	SI	0.94	SI									
VINO 8	6.9 x 10 ³	A	0.17		0.19	NO	0.36	NO	0.60	NO	0.93	SI									
		B	0.17		0.21	NO	0.39	NO	0.60	NO	1.01	SI									
VINO 9	1.4 x 10 ³	A	0.19		0.23	NO	0.40	NO	0.57	NO	0.87	SI									
		B	0.19		0.22	NO	0.38	NO	0.60	NO	0.95	SI									

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 20. Continuación.

MUESTRA	Bacterias acéticas cel/ml	MEDIO	DIA 1		DIA 2		DIA 3		DIA 4		DIA 5		DIA 6		DIA 7		DIA 8		DIA 14	
			HAcO	OLFACCIÓN	HAcO	OLFACCIÓN														
VINO 10	<10	A	0.06		0.10	NO	0.10	NO	0.10	NO	0.11	NO	0.11	NO	0.12	NO	0.12	NO	0.11	NO
		B	0.06		0.10	NO	0.09	NO	0.11	NO	0.10	NO	0.10	NO	0.12	NO	0.13	NO	0.12	NO
VINO 11	5.1 x 10 ⁴	A	0.24		0.34	NO	0.50	NO	0.67	NO	0.93	SI								
		B	0.24		0.32	NO	0.55	NO	0.74	SI	0.99	SI								
VINO 12	7.1 x 10 ³	A	0.17		0.21	NO	0.39	NO	0.57	NO	0.91	SI								
		B	0.17		0.22	NO	0.42	NO	0.63	NO	1.02	SI								
VINO 13	5.5 x 10 ⁴	A	0.21		0.25	NO	0.53	NO	0.69	NO	0.91	SI								
		B	0.21		0.27	NO	0.51	NO	0.75	NO	1.08	SI								
VINO 14	1.8 x 10 ³	A	0.21		0.24	NO	0.41	NO	0.55	NO	0.89	SI								
		B	0.21		0.27	NO	0.42	NO	0.53	NO	0.96	SI								
VINO 15	9.6 x 10 ²	A	0.12		0.13	NO	0.12	NO	0.33	NO	0.59	NO	0.91	SI						
		B	0.12		0.14	NO	0.16	NO	0.40	NO	0.64	NO	0.96	SI						
VINO 16	5.4 x 10 ³	A	0.13		0.18	NO	0.39	NO	0.54	NO	0.88	SI								
		B	0.13		0.19	NO	0.42	NO	0.56	NO	0.91	SI								
VINO 17	4.8 x 10 ³	A	0.16		0.19	NO	0.41	NO	0.55	NO	0.93	SI								
		B	0.16		0.21	NO	0.44	NO	0.59	NO	0.97	SI								
VINO 18	3.6 x 10 ⁴	A	0.25		0.29	NO	0.54	NO	0.71	SI	0.98	SI								
		B	0.25		0.31	NO	0.57	NO	0.74	SI	0.95	SI								

Tabla 20. Continuación.

MUESTRA	Bacterias acéticas cel/ml	MEDIO	DIA 1		DIA 2		DIA 3		DIA 4		DIA 5		DIA 6		DIA 7		DIA 8		DIA 14	
			HAcO	OLFACCIÓN	HAcO	OLFACCIÓN														
VINO 19	3.9 x 10 ⁵	A	0.24		0.33	NO	0.45	NO	0.79	SI	1.21	SI								
		B	0.24		0.35	NO	0.46	NO	0.82	SI	1.24	SI								
VINO 20	4.6 x 10 ³	A	0.18		0.25	NO	0.45	NO	0.69	NO	0.93	SI								
		B	0.18		0.24	NO	0.44	NO	0.71	NO	1.02	SI								
VINO 21	8.1 x 10 ³	A	0.20		0.23	NO	0.44	NO	0.71	NO	0.99	SI								
		B	0.20		0.26	NO	0.46	NO	0.70	NO	0.91	SI								
VINO 22	2.4 x 10 ²	A	0.13		0.13	NO	0.15	NO	0.35	NO	0.62	NO	0.91	SI						
		B	0.13		0.13	NO	0.14	NO	0.38	NO	0.71	NO	0.95	SI						
VINO 23	3.1 x 10 ³	A	0.12		0.18	NO	0.36	NO	0.69	SI	0.95	SI								
		B	0.12		0.17	NO	0.38	NO	0.75	SI	1.15	SI								
VINO 24	3.5 x 10 ³	A	0.15		0.19	NO	0.31	NO	0.65	NO	0.89	SI								
		B	0.15		0.23	NO	0.33	NO	0.71	NO	0.94	SI								
VINO 25	9.1 x 10 ¹	A	0.09		0.10	NO	0.10	NO	0.10	NO	0.15	NO	0.35	NO	0.57	NO	0.85	SI		
		B	0.09		0.10	NO	0.12	NO	0.13	NO	0.16	NO	0.38	NO	0.63	NO	0.93	SI		

La Tabla 20 muestra que los microorganismos presentes en los vinos fueron desarrollándose con el paso del tiempo en los medios de cultivo A y B, y que se generó una cantidad apreciable de ácido acético. La aparición del olor a ácido acético fue ligeramente más rápida en el medio B, en varios casos. Por ello, con los resultados obtenidos se seleccionó finalmente el medio B, ya que presentó una mejor respuesta, con un aumento más rápido de la concentración de acético. Por otra parte, la relación entre el tiempo que se tardó en alcanzar el umbral de percepción de ácido acético y la concentración inicial de bacterias acéticas obtenidos en este ensayo, se utilizarán posteriormente en los apartados 5.5 y 5.6, para generar la tabla de interpretación de los resultados que se obtienen al usar el medio líquido.

5.4. Estudio de mejoras del medio de cultivo líquido.

El medio de cultivo líquido B presentaba un aroma intenso, descrito por el panel de cata como aroma a levaduras, que podía interferir con la detección olfatométrica del ácido acético. Por ello, se estudiaron variaciones en su composición y preparación para tratar de mejorarlo. El objetivo principal de estas modificaciones era conseguir un medio de cultivo con un olor inicial menos intenso, de manera que fuera más sencillo distinguir el aroma del ácido acético. Para ello se diseñaron dos medios de cultivo líquidos nuevos (C y D) a partir del medio B, y se inocularon con el mismo vino tinto (Tempranillo 2017) utilizado en el punto 5.3. En ambos medios se sustituyó la peptona y el extracto de levadura, compuestos que generan en su mayor parte el aroma a levadura, por extracto de guisante y triptona (medio C), y triptona y triptosa (medio D). Además, se añadió otra variante (R), que consistió en la adición de un 2% de resina amberlite en el agua de ambos medios, para que absorbiese lo máximo posible los aromas iniciales. Tras dejar reposar la mezcla durante 24 horas, se retiró la amberlite del medio de cultivo mediante decantación. Los resultados obtenidos al sembrar dicho vino en los diferentes medios de cultivo se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Evolución de la concentración de ácido acético y su detección aromática en los medios B, C, C+R, D y D+R inoculados con un vino con una población de bacterias acéticas de 10^5 cel/ml. El sombreado en rojo indica el momento en el que se detectó el olor a ácido acético (HAcO) en g/l.

DÍA	MEDIO B		MEDIO C		MEDIO C +R		MEDIO D		MEDIO D+R	
	HAcO	OLFACCIÓN	HAcO	OLFACCIÓN	HAcO	OLFACCIÓN	HAcO	OLFACCIÓN	HAcO	OLFACCIÓN
0	0,38	NO	0,38	NO	0,38	NO	0,38	NO	0,38	NO
3	0,69	SI	0,47	NO	0,45	NO	0,48	NO	0,53	NO
4	1,15	SI	0,5	NO	0,49	NO	0,89	SI	0,97	SI
5	1,58	SI	0,54	NO	0,75	NO	1,38	SI	1,36	SI

El aroma inicial que tenían los medios no fue muy diferente entre sí, y la composición R, con amberlite, consiguió disminuir ligeramente el aroma inicial del medio, siendo algo más fácil detectar posteriormente el aroma a ácido acético.

Los resultados indicaron que el medio de cultivo B fue el que más rápido desarrolló un contenido de ácido acético detectable por olfacción, con un día de adelanto respecto al medio D. En este último medio, no se observó variación en el momento de la detección en función del tratamiento del medio con amberlite. En el medio C se detectó menor aumento de la concentración de ácido acético y no hubo detección por olfacción durante 5 días, por lo que este medio quedó eliminado.

El vino sembrado en los medios anteriores se analizó por qPCR al cabo de una semana de incubación (Tabla 22). En ese tiempo todas las bacterias habían crecido en los medios de cultivo, lo que significaba que los medios de cultivo fueron efectivos para que se produjese el crecimiento de bacterias acéticas, pero también de otras bacterias y levaduras presentes en el medio de partida. Por ello, resultó necesario realizar nuevas mejoras en los medios de cultivo para que fueran más selectivos, evitando el desarrollo de otros microorganismos diferentes a las bacterias acéticas (ver punto 5.5).

Tabla 22. Desarrollo en los medios B, C, C+R, D y D+R de distintos géneros de levaduras y bacterias (cel/ml) presentes en un vino durante una semana de incubación.

MEDIO	<i>Acetobacter</i>	<i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>
VINO inicial	1.6×10^5	8.7×10^3	3.2×10^4	19	<10
B	7.7×10^6	6.5×10^4	1.2×10^6	4.4×10^2	<10
C	1.9×10^6	4.2×10^4	1.3×10^6	<10	<10
C + R	7.3×10^6	9.8×10^4	1.1×10^6	<10	<10
D	9.2×10^6	1.4×10^5	1.1×10^6	3×10^2	<10
D+R	5.1×10^6	9.6×10^4	8.3×10^5	4.1×10^2	<10

Posteriormente se analizaron 10 vinos comerciales (vinos 26-35) con los medios B y D+R. Estos vinos fueron además analizados mediante qPCR para estudiar el crecimiento de los microorganismos durante el tiempo de incubación (14 días). También se analizó su composición físico-química al cabo de este tiempo. Los resultados se muestran en las Tablas 23, 24 y 25.

Tabla 23. Análisis físico-químico de los 10 vinos comerciales estudiados.

MUESTRA	Región	Variedad y/o tipo	Grado Alcohólico (%)	pH	Acidez Total (g tartárico/l)	Ácido Acético (g/l)	Ácido L-málico (g/l)	Glucosa-fructosa (g/l)	Sulfuroso libre (mg/l)
VINO 26	Rioja	Tempranillo Tinto	12,50	3,61	5,64	1,12	<0,20	<0,20	16
VINO 27	Rioja	Tempranillo Tinto	13,23	3,67	5,59	0,7	<0,20	<0,20	27
VINO 28	Rias Baixas	Albariño Blanco	13,36	3,23	6,59	0,28	2,87	0,5	19
VINO 29	Rias Baixas	Albariño Blanco	13,32	3,28	6,63	0,41	2,65	1,81	20
VINO 30	Rias Baixas	Albariño Blanco	13,67	3,33	6,85	0,42	2,47	1,86	19
VINO 31	Rioja	Tempranillo Blanco	13,23	3,31	6,25	0,17	2,78	0,48	26
VINO 32	Cariñena	Garnacha Tinto	14,4	3,42	5,6	0,36	<0,20	<0,20	20
VINO 33	Rias Baixas	Albariño Blanco	12,89	3,34	6,34	0,25	2,56	1,99	23
VINO 34	Ribeiro	Tinto	12,1	3,59	5,35	0,48	<0,20	1,31	31
VINO 35	Ribeiro	Tinto	12,13	3,58	5,34	0,48	<0,20	1,26	28

Tabla 24. Análisis mediante q-PCR (cel/ml) de distintos géneros de levaduras y bacterias presentes en los 10 vinos iniciales (VINO), y al cabo de dos semanas de incubación en los medios de cultivo B y D+R.

MUESTRA	MEDIO	<i>Acetobacter</i>	<i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Zygosaccharomyces</i>
VINO 26	VINO	1,8 x 10E5	3,7 x 10E4	5,4 x 10E4	1,8 x 10E3	<10
	B	7,7 x 10E6	6,5 x 10E4	1,2 x 10E6	4,4 x 10E2	<10
	D+R	5,1 x 10E6	9,6 x 10E4	8,3 x 10E5	4,1 x 10E2	<10
VINO 27	VINO	<10	<10	<10	<10	<10
	B	2,2 x 10E4	<10	<10	<10	<10
	D+R	4,2 x 10E1	<10	<10	<10	<10
VINO 28	VINO	<10	<10	<10	<10	<10
	B	<10	<10	<10	<10	<10
	D+R	<10	<10	<10	<10	<10
VINO 29	VINO	<10	<10	<10	<10	<10
	B	<10	<10	<10	<10	<10
	D+R	<10	<10	<10	<10	<10
VINO 30	VINO	<10	<10	<10	<10	<10
	B	<10	<10	<10	<10	<10
	D+R	<10	<10	<10	<10	<10
VINO 31	VINO	<10	<10	<10	<10	<10
	B	<10	<10	<10	<10	<10
	D+R	<10	<10	<10	<10	<10
VINO 32	VINO	<10	<10	<10	<10	<10
	B	<10	<10	<10	<10	<10
	D+R	<10	<10	<10	<10	<10
VINO 33	VINO	<10	<10	<10	<10	<10
	B	<10	<10	<10	<10	<10
	D+R	<10	<10	<10	<10	<10
VINO 34	VINO	<10	<10	<10	<10	<10
	B	<10	<10	<10	<10	<10
	D+R	<10	<10	<10	<10	<10
VINO 35	VINO	<10	<10	<10	<10	<10
	B	<10	<10	<10	<10	<10
	D+R	<10	<10	<10	<10	<10

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 25. Evolución de la concentración de ácido acético (g/l HAcO) y su detección aromática en 10 vinos sembrados en los medios B y D+R. El sombreado en rojo indica el momento en el que se detectó el olor a ácido acético.

Bacterias acéticas cel/ml	MEDIO	DIA 2		DIA 4		DIA 7		DIA 14		
		HAcO	OLFACCIÓN	HAcO	OLFACCIÓN	HAcO	OLFACCIÓN	HAcO	OLFACCIÓN	
		VINO 26	1.8 x 10 ⁵	B	0,73	SI	0,99	SI		
		D+R	0,83	SI	1,07	SI				
VINO 27	<10	B	0,34	NO	0,35	NO	0,34	NO	1,01	SI
		D+R	0,37	NO	0,38	NO	0,37	NO	0,38	NO
VINO 28	<10	B	0,17	NO	0,18	NO	0,18	NO	0,17	NO
		D+R	0,19	NO	0,19	NO	0,19	NO	0,17	NO
VINO 29	<10	B	0,22	NO	0,23	NO	0,23	NO	0,21	NO
		D+R	0,22	NO	0,21	NO	0,23	NO	0,23	NO
VINO 30	<10	B	0,23	NO	0,24	NO	0,23	NO	0,23	NO
		D+R	0,23	NO	0,23	NO	0,23	NO	0,23	NO
VINO 31	<10	B	0,12	NO	0,12	NO	0,12	NO	0,1	NO
		D+R	0,11	NO	0,12	NO	0,12	NO	0,13	NO
VINO 32	<10	B	0,21	NO	0,2	NO	0,25	NO	0,41	NO
		D+R	0,20	NO	0,20	NO	0,23	NO	0,39	NO
VINO 33	<10	B	0,16	NO	0,16	NO	0,17	NO	0,15	NO
		D+R	0,16	NO	0,18	NO	0,16	NO	0,17	NO
VINO 34	<10	B	0,27	NO	0,26	NO	0,27	NO	0,27	NO
		D+R	0,25	NO	0,25	NO	0,27	NO	0,26	NO
VINO 35	<10	B	0,27	NO	0,27	NO	0,26	NO	0,26	NO
		D+R	0,25	NO	0,26	NO	0,26	NO	0,27	NO

De los 10 vinos tan solo uno (vino 26) presentó una concentración inicial elevada de bacterias acéticas y de otros microorganismos enológicos (Tabla 24), y por ello el día 2 ya se detectó la presencia de ácido acético por olfacción (Tabla 25).

El resto de los vinos que contenían niveles inferiores a 10 cel/ml de bacterias acéticas y de otros microorganismos, no desarrollaron en ninguno de los medios de cultivo aroma a acético durante el

tiempo de incubación, con la excepción del vino 27, que presentó en el medio B olor a ácido acético el día 14. En este último vino, se observó un ligero crecimiento de bacterias acéticas en ambos medios. La concentración inicial de bacterias acéticas en dicho vino fue inferior a 10^4 (Tabla 24), y al cabo de dos semanas (Tabla 25) la concentración era de 10^4 cel/ml en el medio B, mientras que en el medio D+R no llegaron a 50 cel/ml.

Al observar los datos de la Tabla 24, se puede ver que cuando las bacterias acéticas estuvieron presentes en las muestras de vino, crecieron durante el tiempo de incubación en ambos medios B y D+R, pero de forma más intensa en el medio B, lo que indicó que es más adecuado para el crecimiento de este grupo de microorganismos. Aunque el uso de amberlite consiguió minimizar ligeramente el aroma inicial de los medios, este tratamiento se descartó debido a la pérdida de efectividad en la detección de bacterias acéticas (vino 27, Tabla 24), y también porque no sería viable desde el punto de vista económico dada la cantidad de este producto necesaria para producir el medio de cultivo a gran escala. Además, su adición no mejoró el tiempo de detección (Tabla 21).

Por ello, se decidió seleccionar el medio de cultivo B, dado que las bacterias acéticas crecieron bien, y aunque el olor inicial del medio no se pudo mejorar, la detección del ácido acético era posible cuando la concentración era superior al umbral de detección.

5.5. Estudio de la caducidad y estabilidad del medio de cultivo

Una vez seleccionado el medio de cultivo B, se estudió la estabilidad del mismo conservado a temperatura ambiente. Se observó que al cabo de una semana de conservación los botes con el medio presentaban turbidez y presencia de mohos en el 50 % de los casos. Por ello, se plantearon una serie de estudios sobre su viabilidad, conservación y estabilidad.

El objetivo era que el medio tuviese una fecha de caducidad alta, y que se conservara fácilmente, siendo lo ideal que fuera a temperatura ambiente. Para conseguir incrementar su estabilidad en esas condiciones, se añadieron al medio 100 mg/l de natamicina (pimaricina) para inhibir crecimiento de levaduras y hongos y 12,5 mg/l de penicilina para evitar el crecimiento de lactobacterias. El medio se esterilizó en autoclave y posteriormente en una campana de flujo laminar con luz ultravioleta se llenaron los botes con 20 ml de medio de cultivo. Estos botes habían pasado 24 horas en una solución de etanol al 70 % antes de ser llenados. Se observó que el 30 % de los botes se conservaba inalterado a temperatura ambiente durante más de un mes, el 50 % lo hacían unas dos semanas y el resto se degradaba en menos de 10 días. El principal problema fue el crecimiento de mohos en los botes con el medio de cultivo. Posiblemente el problema radicaba en la forma de preparar el medio y en que los botes eran de plástico no estéril. Es cierto que si se usasen botes de vidrio se podrían esterilizar en autoclave, y si se usaran botes ya esterilizados se minimizarían los riesgos durante la preparación del producto. Pero el objetivo de esta tesis era conseguir un medio para analizar bacterias acéticas en las bodegas y, por ello, era importante el coste final del producto para que sea competitivo frente a otras técnicas de análisis como la PCR.

Por ello se pensó en añadir otros aditivos que pudiesen evitar el enturbiamiento y la proliferación de mohos. Para ello se adicionó al medio de cultivo antes de esterilizar, cristal de violeta (5 µl) y sales biliares (0,5 g/l), ya que son inhibidores de bacterias Gram positivas; y después de esterilizar 0,04 g/l de cicloheximida y 0,66 g/l de pimaricina para inhibir el crecimiento de hongos. Ello permitió que el 50 % de los botes se conservara a temperatura ambiente durante más de un mes, el 30 % dos semanas y el resto menos de 10 días. Aunque se produjo una mejora en los resultados de estabilidad del medio de cultivo, no se consideró suficiente para un producto que ha de ser comercializado. Por ello, se decidió comprobar la estabilidad del medio inicial conservado en refrigeración a temperaturas de 4°C. La conservación durante un periodo de más de 6 meses de botes con el medio de cultivo en una cámara refrigerada a 4°C dio como resultado que el 100% de los botes se mantuvieran estables. Los resultados se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26. Estudio de caducidad del medio de cultivo.

Temperatura de conservación	Semana de detección de enturbiamiento del medio		
	10 % botes con enturbiamiento	30 % botes con enturbiamiento	50 % botes con enturbiamiento
4 °C	> 25 semanas	> 25 semanas	> 25 semanas
Tª Ambiente	1 semana	2 semanas	5 semanas
30 °C	< 1 semana	1 semana	2 semanas

Por lo tanto, la composición definitiva del medio y las condiciones de conservación fueron las siguientes:

Tabla 27. Medio Final de cultivo líquido para bacterias acéticas.

Componentes	Cantidad
Extracto de levadura	4 g
Peptona	5 g
Glucosa	50 g
H ₂ PO ₄	0,55 g
CaCl ₂	0,125 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,125 g
MnSO ₄	0,0025 g
Agua (H ₂ O)	Completar hasta 1000 ml

Agregar antes de esterilizar 0,5 g de sales biliares y 5 microlitros de cristal de violeta.

Agregar después de esterilizar 0,3 ml de natamicina (pimaricina) (concentración 0,6 g/l) y 0,04 g de cicloheximida.

Conservar en refrigeración a 4 °C.

5.6. Estudios para la cuantificación de bacterias acéticas

Para evaluar la capacidad del medio diseñado en la detección y cuantificación de bacterias acéticas, se estudiaron diferentes muestras reales de vino y mosto con diferentes concentraciones de bacterias acéticas, medidas mediante q-PCR. De esta forma se pudo comprobar la respuesta del medio de cultivo a las diferentes concentraciones de bacterias acéticas en diferentes tipos de vinos, y se trató de relacionar el tiempo que se tardó en alcanzar el umbral de percepción del ácido acético con la concentración inicial de bacterias acéticas.

Se seleccionaron un mosto, un vino espumoso, un vino oloroso y un vino tinto, previamente analizados en el laboratorio. Las características de las muestras al inicio del estudio se muestran en la Tabla 28. A partir de dichos vinos se prepararon muestras con distintos niveles de concentración de bacterias acéticas. Para ello se realizaron diluciones seriadas hasta conseguir concentraciones de bacterias acéticas entre 10 y 10⁵ cel/ml. La siembra en el medio de cultivo de las distintas diluciones se realizó por triplicado.

Tabla 28. Población media de bacterias acéticas y niveles de ácido acético iniciales en los vinos empleados para el estudio de cuantificación.

MUESTRA	Región	Código	Bacterias acéticas (cel/ml)	Ácido acético (g/l)
Mosto	Jumilla	M	$2,3 \times 10^3$	0,4
Vino espumoso	Cataluña	E	$6,9 \times 10^4$	0,65
Vino Oloroso	Jerez	O	$5,3 \times 10^3$	0,61
Vino Tinto	Extremadura	T	$6,6 \times 10^5$	0,87

Los resultados de la evolución en la formación de ácido acético y su detección por olfatometría se muestran en la Tabla 29. Como se puede observar en dicha tabla, la velocidad de acumulación del ácido acético en el medio dependió de la cantidad inicial de bacterias acéticas que había en la muestra inoculada: cuanto mayor era la concentración de bacterias, antes se alcanzaba el umbral de detección. También se observaron diferencias en el tiempo de detección olfatométrica en función de la matriz (mosto y distintos tipos de vino) inoculada en el medio.

Tabla 29. Valores medios de la evolución de la concentración de ácido acético (g/l) de las diluciones realizadas con las muestras sembradas en el medio de cultivo a lo largo del tiempo. El sombreado en rojo indica el momento en el que se detectó el olor a ácido acético.

MUESTRA	BACTERIAS ACÉTICAS (cel/ml)	Ácido acético											
		DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 10	DIA 11	DIA 12
M1	$2,30 \times 10^1$	0	0,1	0,16	0,43	0,87							
M2	$2,30 \times 10^2$	0,11	0,16	0,28	0,61	0,93							
M3	$2,30 \times 10^3$	0,13	0,18	0,42	0,75	1,06							
E1	$6,90 \times 10^1$	0	0	0	0	0	0,25	0,41	0,67	0,89	1,1		
E2	$6,90 \times 10^2$	0	0	0	0,19	0,42	0,6	0,72	0,95				
E3	$6,90 \times 10^3$	0,12	0,19	0,32	0,58	0,7	0,84	1,06					
E4	$6,90 \times 10^4$	0,22	0,31	0,54	0,65	0,79	0,9	1,19					
O1	$5,30 \times 10^1$	0	0	0,12	0,19	0,3	0,45	0,68	0,85	1,03			
O2	$5,30 \times 10^2$	0	0,1	0,18	0,27	0,39	0,57	0,79	1,05				
O3	$5,30 \times 10^3$	0,17	0,2	0,25	0,3	0,45	0,68	0,81	1,02				
T1	$6,60 \times 10^1$	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,16	0,27	0,51	0,86
T2	$6,60 \times 10^2$	0	0	0	0	0,16	0,25	0,43	0,68	0,91	1,17		
T3	$6,60 \times 10^3$	0	0	0,15	0,29	0,51	0,82	1,05	1,43				
T4	$6,60 \times 10^4$	0,1	0,15	0,32	0,63	0,92	1,27	1,58					
T5	$6,60 \times 10^5$	0,3	0,36	0,69	0,95	1,15	1,69						

La Tabla 29 muestra cómo en el mosto, un medio sin etanol y abundante azúcar, el aumento de la concentración de ácido acético en el medio es muy rápida. El umbral de percepción (0,7 g/l) para concentraciones de bacterias acéticas del orden 10^1 cel/ml (M1) y 10^2 cel/ml (M2) se alcanzó el día 5.

En la Tabla 29, el medio sembrado con diluciones de un vino espumoso, se puede observar una acumulación de ácido acético más lenta que en el caso del mosto. Ello se debe probablemente, a la presencia de etanol, ausencia de azúcar y a la presión generada por el anhídrido carbónico en el vino de partida, que podrían ralentizar el crecimiento de las bacterias. En este caso, el umbral de percepción (0,7 g/l) para concentraciones de bacterias acéticas del orden 10^1 se alcanza el día 8. Este retraso se puede observar también en los vinos oloroso y tinto, en los que dicho umbral para concentraciones de bacterias acéticas del orden 10^1 se alcanza los días 7 y 12 respectivamente. Este último valor podría tratarse de un

error durante la inoculación, puesto que no tiene concordancia con el resto de tiempos observados en la muestra de vino tinto.

Si comparamos la evolución en la acumulación de ácido acético en las 4 matrices analizadas con una población similar de 10^3 cel/ml de bacterias acéticas. Se pueden apreciar las diferencias mencionadas también a esa concentración inicial de bacterias. En este caso, el tiempo que se tarda en alcanzar el umbral de percepción en el mosto, vino espumoso, vino oloroso y vino tinto es de 4, 5, 6 y 6 días respectivamente.

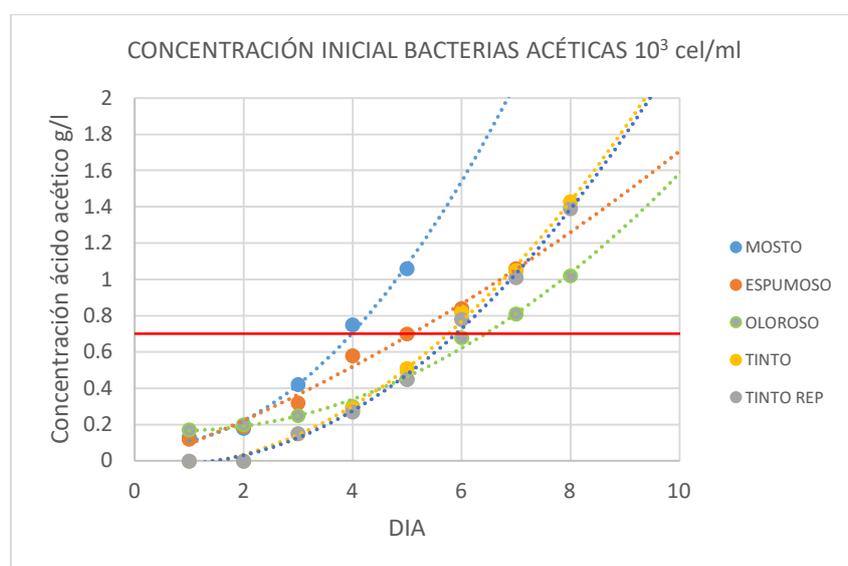


Figura 8. Evolución de la concentración de ácido acético en el medio de cultivo sembrado con distintas matrices (mosto, vino espumoso, vino oloroso y vino tinto) que contenían una población inicial de bacterias acéticas de 10^3 cel/ml.

Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados anteriores, podría establecerse una relación entre tiempo de detección por olfacción y población inicial de bacterias acéticas en cada tipo de vino.

Para verificar la hipótesis anterior, se estudió la evolución de la población de bacterias acéticas inoculando el medio de cultivo con una concentración baja (10^2 UFC/ml) de *Acetobacter aceti* crecida en dos medios: medio de cultivo, y vino estéril. Los ensayos se realizaron por triplicado y se analizaron periódicamente las concentraciones de ácido acético formado en el medio y las poblaciones de bacterias acéticas (Tabla 30).

Tabla 30. Resultados de la formación de ácido acético (g/l) y del crecimiento de *A. aceti* en el medio de cultivo a lo largo del tiempo. El sombreado en rojo indica el momento en el que se detectó el olor a ácido acético.

MUESTRA	DIA 1		DIA 2		DIA 3		DIA 4		DIA 5		DIA 8		DIA 9	
	HAcO g/l	PCR cel/ml	HAcO	PCR										
Medio Adicionado R1	0	240 ± 20	0,08 ± 0,02	250 ± 20	0,18 ± 0,02	273 ± 21	0,31 ± 0,02	377 ± 12	0,40 ± 0,03	510 ± 10	0,88 ± 0,03	1567 ± 153	1,07 ± 0,04	3100 ± 100
		0,23 ± 0,01	270 ± 20	0,25 ± 0,02	280 ± 10	0,35 ± 0,02	303 ± 6	0,48 ± 0,03	433 ± 15	0,59 ± 0,04	610 ± 20	0,90 ± 0,04	1800 ± 10	1,17 ± 0,04

Los resultados indicaron que el aumento de la concentración de ácido acético y de la población de bacterias acéticas evolucionan paralelamente. La reproducibilidad de estos ensayos fue alta, con valores de desviación estándar inferiores al 10 % (excepto en concentraciones de ácido acético inferiores a 0,20 g/l).

No se encontraron diferencias en función de la matriz de crecimiento de *A. aceti* (medio de cultivo o vino estéril). A pesar de que el vino aporta una concentración inicial de ácido acético, el momento en el que se alcanzó el umbral de percepción fue el mismo.

5.7. Estudios de la respuesta del medio para diferentes especies de bacterias acéticas.

Se estudió la respuesta del medio de cultivo con diferentes especies de bacterias acéticas capaces de generar ácido acético. Para ello se utilizaron tres cepas de bacterias: *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter oxidans* y *Komagateibacter europaeus*. Estas cepas, que procedían de la Colección Española de Cultivos Tipo (ver Tabla 13, punto 4.4.2), se inocularon en el medio de cultivo líquido a diferentes concentraciones.

La Tabla 31 presenta la evolución de la concentración de ácido acético a lo largo del tiempo de las tres bacterias. Se observó como la concentración de ácido acético aumentó con el paso de los días y lo hizo a mayor velocidad cuanto mayor fue la concentración inicial de bacterias en todos los casos. Cuando la bacteria inoculada fue *Acetobacter aceti*, la concentración de ácido acético aumentó rápidamente. La cinética para *Gluconobacter oxidans* fue diferente respecto a *Acetobacter*. En este caso, poblaciones inferiores a 10⁴ UFC/ml, tardaron casi 10 días más que *Acetobacter aceti* en alcanzar el umbral de detección de ácido acético en el medio. Sin embargo, con poblaciones más altas (10⁴-10⁵ UFC/ml), el umbral de detección se alcanzó sólo dos días más tarde que con *Acetobacter aceti*. Poblaciones superiores a 10⁴-10⁵ UFC/ml, alcanzaron el umbral de detección en el mismo tiempo en ambas especies.

Finalmente, *Komagateibacter europaeus* presentó una cinética de producción de ácido acético similar a la de *Acetobacter aceti* al inocularlo en poblaciones superiores a 10^6 UFC/ml, pero en niveles inferiores, la producción fue ligeramente más lenta.

Las figuras 9 y 10 representan la variación de la concentración de ácido acético con el paso de los días en el medio de cultivo, diferenciando cuando se inocula *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter oxidans* u *Komagateibacter europaeus*. Cuando la población fue elevada, 10^7 UFC/ml, el aumento del ácido acético en el medio fue muy rápido y la cinética es similar entre las tres bacterias. Pero cuando la población fue más baja, 10^3 UFC/ml, el crecimiento de *Gluconobacter oxidans* fue más lento. Esta especie no suele estar presente en vinos terminados, por lo que su interferencia en la detección de *Acetobacter* sería algo excepcional, como también lo sería la presencia de *Komagateibacter europaeus*.

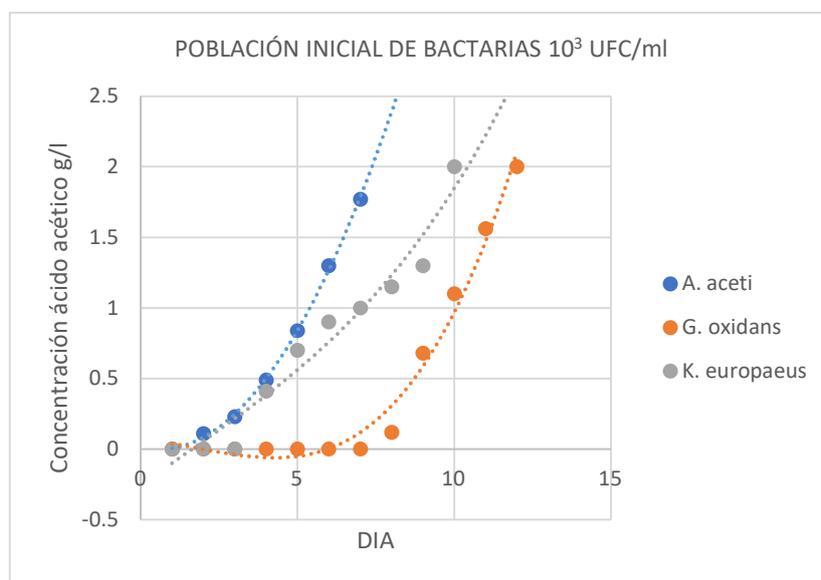


Figura 9. Evolución de la concentración de ácido acético en tres botes con el medio inoculado directamente con diferentes especies de bacterias acéticas en una población 10^3 UFC/ml.

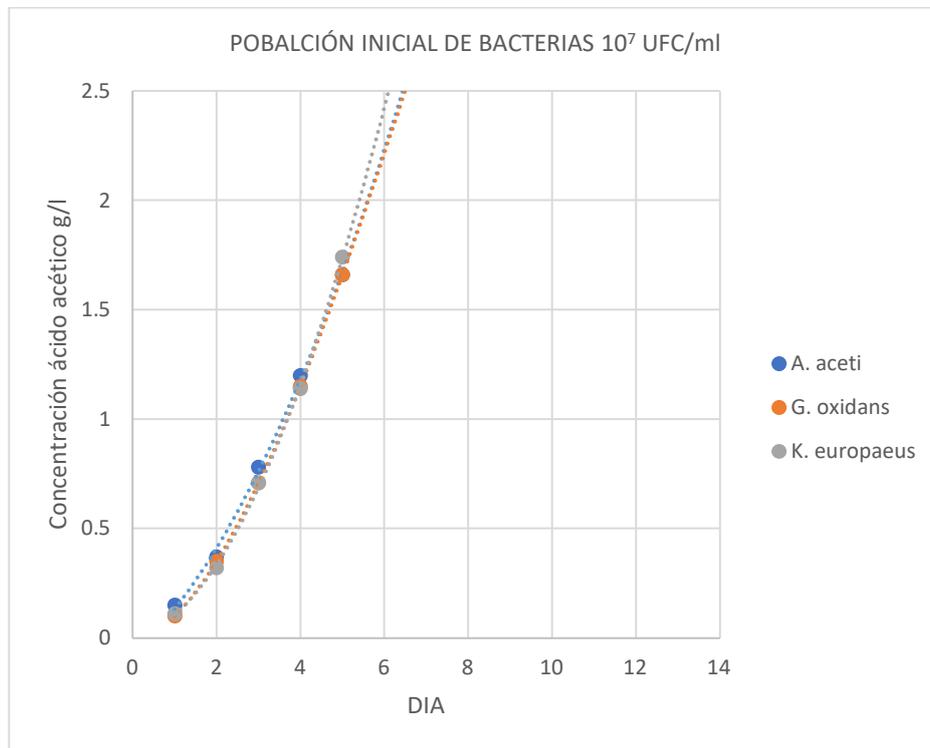


Figura 10. Evolución de la concentración de ácido acético en tres botes con el medio inoculado directamente con diferentes especies de bacterias acéticas en una población 10^7 UFC/ml.

En la Tabla 31 se muestra un resumen de los resultados de la evolución de la concentración de ácido acético en las tres bacterias a diferentes concentraciones. También se indica el día en que el acético generado fue detectable por olfacción. Estos datos permitirían establecer una relación entre los días que tarda en aparecer el olor a acético y la población inicial de bacterias acéticas en el medio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 31. Evolución de la concentración (g/l) de ácido acético en el medio inoculado directamente con diferentes concentraciones de bacterias acéticas. El sombreado en rojo indica el momento en el que se detectó el olor a ácido acético. A (*Acetobacter aceti*), G (*Gluconobacter oxidans*), K (*Komagateibacter europaeus*).

MUESTRA	POBLACIÓN (UFC/ml)	Ácido acético (g/l)											
		DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 10	DIA 11	DIA 12
A1	1,00E+07	0,15	0,37	0,78	1,2	1,66							
A2	1,00E+06	0,14	0,36	0,77	1,21	1,66							
A3	1,00E+05	0,1	0,23	0,54	0,97	1,44							
A4	1,00E+04	0	0,15	0,42	0,78	1,19							
A5	1,00E+03	0	0,11	0,23	0,49	0,84	1,3	1,77					
A6	1,00E+02	0	0	0	0,23	0,52	1	1,47					
A7	10	0	0	0	0	0	0,31	0,55					
G1	1,00E+09	0,17	0,43	0,88	1,41	2,01							
G2	1,00E+08	0,12	0,39	0,75	1,12	1,54							
G3	1,00E+07	0,1	0,35	0,71	1,15	1,66							
G4	1,00E+06	0,1	0,36	0,72	1,01	1,15	1,57	1,82					
G5	1,00E+05	0	0	0	0,54	0,92	1,31	2,06					
G6	1,00E+04	0	0	0	0,19	0,37	0,68	1,05					
G7	1,00E+03	0	0	0	0	0	0	0	0,12	0,68	1,1	1,56	2
G8	1,00E+02	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,15	0,27		
K1	1,00E+09	0,11	0,35	0,75	1,09	1,59							
K2	1,00E+08	0,1	0,31	0,68	1,13	1,81							
K3	1,00E+07	0,11	0,32	0,71	1,14	1,74							
K4	1,00E+06	0,1	0,29	0,67	1,02	1,34							
K5	1,00E+05	0	0	0	0,49	0,81	1,45	1,9					
K6	1,00E+04	0	0	0	0,53	0,86	1,19	1,49					
K7	1,00E+03	0	0	0	0,41	0,7	0,9	1	1,15	1,3	2		
K8	1,00E+02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,36

5.8. Interferencia de otros microorganismos (levaduras y bacterias lácticas)

Durante la conservación del vino, además de bacterias acéticas, pueden estar presentes una amplia variedad de microorganismos. Debido a que éstos pueden generar compuestos que oculten el aroma a ácido acético y también establecer sinergias con las bacterias acéticas, se evaluó la interferencia de los mismos en la detección de bacterias acéticas con el medio diseñado. Para ello, se realizaron dos estudios. En el primero de ellos se inocularon individualmente en el medio diferentes microorganismos habituales en los vinos, y en el segundo se inocularon estos mismos microorganismos simultáneamente con bacterias acéticas.

En los dos ensayos, los microorganismos se sembraron en el medio de dos formas diferentes: directamente y mediante su mezcla previa en un vino esterilizado en autoclave. Se emplearon los microorganismos, referenciados en la Tabla 13: *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter oxidans*, *Komagataeibacter europaeus*, *Oenococcus oeni*, *Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Brettanomyces bruxellensis* y *Penicillium funiculosum*. La concentración empleada para la siembra del medio en todos los casos fue de 10^4 UFC/ml. Los resultados de producción de ácido acético a lo largo del tiempo se muestran en la Tabla 32.

Tabla 32. Evolución de la concentración (g/l) de ácido acético en el medio de cultivo inoculado con diferentes microorganismos diseminados directamente en el medio (MEDIO) o en vino estéril (VINO).

Microorganismo	Muestra	Ácido acético (g/l)									
		DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 14
<i>O. oeni</i>	MEDIO 1	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0.1	0.15
	VINO 1	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.23	0.23	0.25	0.25	0.30
<i>P. membranaefaciens</i>	MEDIO 2	0	0	0	0	0	0	0.08	0.12	0.12	0.18
	VINO 2	0.15	0.15	0.20	0.20	0.19	0.21	0.22	0.25	0.29	0.35
<i>S. cerevisae</i>	MEDIO 3	0	0	0	0	0	0	0	0.08	0.10	0.15
	VINO 3	0.20	0.20	0.19	0.21	0.24	0.24	0.26	0.31	0.31	0.36
<i>B. bruxellensis</i>	MEDIO 4	0	0	0	0	0	0	0.10	0.12	0.12	0.18
	VINO 4	0.21	0.21	0.22	0.22	0.23	0.22	0.25	0.26	0.27	0.34
<i>P. funiculosum</i>	MEDIO 5	0	0	0	0	0	0	0	0.10	0.10	0.15
	VINO 5	0.22	0.22	0.24	0.24	0.23	0.22	0.24	0.28	0.31	0.35

Los resultados de la Tabla 32, correspondientes a la inoculación individual de los microorganismos, indicaron que los cinco microorganismos estudiados no presentaron una producción de ácido acético relevante en los 14 días que duró el estudio. Los valores más elevados de ácido acético en la muestra sembrada en vino estéril se debieron al contenido presente inicialmente en dicho vino. Se comprobó además por olfacción que ninguno de los diez botes analizados presentó alteraciones del aroma. En los ensayos realizados anteriormente se había observado que, al inocular bacterias acéticas en el medio, el aroma a ácido acético se detectaba en menos de diez días, por lo que la presencia de estos otros microorganismos, no interferiría en la detección de bacterias acéticas con este medio.

Los datos de la inoculación conjunta de *Acetobacter aceti* con cada uno de los cinco microorganismos anteriores (todos en concentraciones de 10^4 UFC/ml), para analizar la existencia de sinergias o interferencias entre ellos se muestran en la Tabla 32. Los resultados indicaron que la cinética de producción de ácido acético en el medio en presencia de otros microorganismos fue similar a la

encontrada cuando actúa individualmente *Acetobacter aceti* (Tabla 33). En ambos casos, el tiempo que transcurrió desde la siembra del medio hasta la detección del ácido acético por olfacción fue de 3-4 días, por lo que se deduce que no se produjo interferencia en la detección del ácido acético por la presencia de los otros microorganismos.

Tabla 33. Evolución de la concentración (g/l) de ácido acético en el medio de cultivo inoculado conjuntamente con *Acetobacter aceti* y otros microorganismos diseminados directamente en el medio (MEDIO) o en vino estéril (VINO). El sombreado en rojo indica el momento en el que se detectó el olor a ácido acético.

MICROORGANISMO	MUESTRA	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5
<i>O. oeni</i> y <i>A. aceti</i>	MEDIO 6	0	0.10	0.38	0.69	1.51
	VINO 6	0.19	0.31	0.61	0.75	1.63
<i>P. membranifaciens</i> y <i>A. aceti</i>	MEDIO 7	0	0.08	0.36	0.65	1.47
	VINO 7	0.21	0.33	0.59	0.80	1.72
<i>S. cerevisiae</i> y <i>A. aceti</i>	MEDIO 8	0	0.10	0.39	0.71	1.64
	VINO 8	0.19	0.31	0.64	0.76	1.69
<i>B. bruxellensis</i> y <i>A. aceti</i>	MEDIO 9	0	0.11	0.40	0.70	1.35
	VINO 9	0.22	0.35	0.66	0.79	1.63
<i>P. funiculosum</i> y <i>A. aceti</i>	MEDIO 10	0	0.14	0.49	0.72	1.41
	VINO 10	0.19	0.31	0.59	0.70	1.42

Los resultados del mismo estudio realizado con otras especies de bacterias acéticas diferentes a *Acetobacter aceti*, se muestran en las Tabla 34 (*Gluconobacter oxidans*) y 35 (*Komagataeibacter europaeus*). Los resultados indican que tampoco hubo interferencia en la detección por la presencia de los otros microorganismos enológicos. En estos casos el tiempo de detección olfatométrica fue igual que al inocular individualmente las bacterias acéticas, 6 días en el caso de *G. Oxydans* y 5 en el caso de *K. europaeus* (Tabla 31).

Tabla 34. Evolución de la concentración (g/l) de ácido acético en el medio de cultivo inoculado conjuntamente con *Gluconobacter oxidans* y otros microorganismos diseminados directamente en el medio (MEDIO) o en vino estéril (VINO). El sombreado en rojo indica el momento en el que se detectó el olor a ácido acético.

MUESTRA	MICROORGANISMO	Ácido acético						
		DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7
<i>O. oeni</i> y <i>G. oxidans</i>	MEDIO 16	0	0	0	0.15	0.34	0.62	0.98
	VINO 16	0.20	0.19	0.20	0.33	0.51	0.79	1.15
<i>P. membranifaciens</i> y <i>G. oxidans</i>	MEDIO 17	0	0	0	0.14	0.36	0.65	1.01
	VINO 17	0.18	0.18	0.21	0.33	0.53	0.77	1.16
<i>S. cerevisiae</i> y <i>G. oxidans</i>	MEDIO 18	0	0	0	0.21	0.40	0.65	1.07
	VINO 18	0.21	0.20	0.22	0.43	0.59	0.81	1.19
<i>B. bruxellensis</i> y <i>G. oxidans</i>	MEDIO 19	0	0	0	0.17	0.35	0.60	0.99
	VINO 19	0.19	0.19	0.18	0.39	0.62	0.83	1.24
<i>P. funiculosum</i> y <i>G. oxidans</i>	MEDIO 20	0	0	0	0.14	0.31	0.69	0.98
	VINO 20	0.20	0.20	0.21	0.39	0.55	0.82	1.16

Tabla 35. Evolución de la concentración (g/l) de ácido acético en el medio de cultivo inoculado conjuntamente con *Komagataeibacter europaeus* y otros microorganismos diseminados directamente en el medio (MEDIO) o en vino estéril (VINO). El sombreado en rojo indica el momento en el que se detectó el olor a ácido acético.

MUESTRA	MICROORGANISMO	Ácido acético					
		DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6
<i>O. oeni</i> y <i>K. europaeus</i>	MEDIO 21	0	0	0	0.46	0.78	1.09
	VINO 21	0.19	0.18	0.19	0.61	0.87	1.34
<i>P. membranafaciens</i> y <i>K. europaeus</i>	MEDIO 22	0	0	0	0.39	0.74	1.01
	VINO 22	0.20	0.20	0.22	0.61	0.89	1.17
<i>S. cerevisiae</i> y <i>K. europaeus</i>	MEDIO 23	0	0	0.10	0.41	0.76	1.05
	VINO 23	0.18	0.18	0.24	0.62	0.92	1.34
<i>B. bruxellensis</i> y <i>K. europaeus</i>	MEDIO 24	0	0	0	0.29	0.70	0.99
	VINO 24	0.20	0.20	0.26	0.59	0.88	1.19
<i>P. funiculosum</i> y <i>K. europaeus</i>	MEDIO 25	0	0	0	0.47	0.78	1.14
	VINO 25	0.20	0.20	0.19	0.53	0.82	1.08

Para completar el estudio de la interferencia de microorganismos en la detección del ácido acético producido por bacterias acéticas, se realizó otro estudio en el que se analizaron vinos contaminados con levaduras (*Saccharomyces* y *Brettanomyces*), mohos y bacterias acéticas y lácticas. Estos vinos procedían de estudios intercomparativos de microorganismos de Bipea. Para el estudio se disponía de 4 muestras con diferentes microorganismos en concentraciones conocidas, referenciadas en el punto 4.1.8.

La Tabla 36 muestra los resultados obtenidos tras inocular el medio de cultivo con los vinos de Bipea: bacterias lácticas (LACT), *Brettanomyces* (BRETT), bacterias acéticas (ACET directamente y con dilución 1/10), mohos y levaduras (Y-M), y mezclas entre ellos en proporción 1/1. La concentración de los diferentes microorganismos en las muestras fue: LACT (*Lactobacillus rhamnosus* $2,4 \times 10^3$ UFC/ml), BRETT (*Dekera bruxellensis* $5,6 \times 10^5$ UFC/ml), ACET (*Acetobacter aceti* $3,7 \times 10^5$ UFC/ml) y Y-M (*Aspergillus brasiliensis* $1,8 \times 10^3$ UFC/ml y *Saccharomyces cerevisiae* $3,5 \times 10^5$ UFC/ml).

Como se puede observar, las muestras contaminadas con bacterias lácticas y *Brettanomyces* tardaron 10 días en dar positivo por olfacción. En el caso de las bacterias acéticas, el tiempo de detección fue

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

similar al encontrado en ensayos anteriores y los medios sembrados con vinos contaminados con *Saccharomyces* y mohos no produjeron acético detectable en los días que duró el ensayo. Cuando el medio se inoculó con mezcla de vinos que contenían distintos microorganismos y bacterias acéticas, los tiempos de respuesta fueron similares a los encontrados cuando sólo había bacterias acéticas. Sólo en el caso de mezcla de vinos con bacterias acéticas y lácticas o levaduras y mohos la detección se adelantó un día. Por lo tanto, no hubo una gran variación en la cinética de formación de ácido acético observada en los puntos anteriores.

Tabla 36. Evolución de la concentración (g/l) de ácido acético en el medio de cultivo inoculado con muestras de vino provenientes de intercomparativo Bipea.

LACT (*Lactobacillus rhamnosus*), BRETT (*Dekera bruxellensis*), ACET (*Acetobacter acetii*)
y Y-M (*Aspergillus brasiliensis* y *Saccharomyces cerevisiae*)

MUESTRA	MICROORGANISMO	Ácido acético									
		DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 10
BIP 1	LACT	0.13	0.13	0.13	0.13	0.18	0.25	0.34	0.39	0.55	0.97
BIP 2	BRETT	0.13	0.12	0.13	0.13	0.21	0.29	0.45	0.51	0.69	1.06
BIP 3	ACET	0.15	0.23	0.31	0.42	0.64	0.98	1.37			
BIP 4	ACET 1/10	0.15	0.18	0.20	0.29	0.40	0.65	0.95	1.26		
BIP 5	Y-M	0.13	0.13	0.12	0.13	0.14	0.16	0.21	0.25	0.34	0.41
BIP 6	ACET + BRETT	0.15	0.16	0.25	0.48	0.71	0.95	1.46			
BIP 7	ACET + LACT	0.15	0.21	0.28	0.61	0.83	1.32				
BIP 8	ACET + Y-M	0.14	0.26	0.35	0.64	0.90	1.41				
BIP 9	ACET 1/10 + LACT	0.17	0.23	0.36	0.48	0.71	0.93	1.21			

5.9. Estudios con diferentes vinos y mostos

Una vez seleccionado y validado el medio de cultivo se estudió su eficacia en diferentes muestras de vinos (45) y mostos (4), elaborados con diferentes variedades y procedentes de distintas zonas, para analizar su utilidad en diferentes tipos de muestras. Las muestras fueron previamente analizadas mediante qPCR para determinar la población inicial de microorganismos (Tabla 38), y caracterizadas fisicoquímicamente (Tabla 37). La Tabla 39 muestra resultados de concentración de ácido acético y de olfacción durante 14 días de dichas muestras inoculadas en el medio líquido. En naranja se marcan los casos en los que hubo dudas de la detección olfativa del aroma a ácido acético, y en rojo cuando fue totalmente claro.

Tabla 37. Análisis físico-químico de 45 vinos y 4 mostos procedentes de bodegas comerciales.

MUESTRA	Región	Variedad y/o tipo	Grado Alcohólico (%)	pH	Acidez Total (g tartárico/l)	Ácido Acético (g/l)	Ácido L-málico (g/l)	Glucosa-fructosa (g/l)	Sulfuroso libre (mg/l)
MOSTO 1	Ciudad Real	Mosto	-	-	-	0,15	-	-	-
MOSTO 2	Somontano	Mosto	-	-	-	0,09	-	-	-
MOSTO 3	Rioja	Mosto	-	-	-	0,10	-	-	-
MOSTO 4	Rioja	Mosto	-	-	-	0,10	-	-	-
VINO 36	Cadiz	Oloroso	14,70	3,51	5,77	1,26	<0,20	<0,20	35
VINO 37	Sevilla	Blanco	12,75	3,23		0,31	2,27	<0,20	27
VINO 38	Campo Borja	Rosado semiDulce	12,19	3,12	6,41	0,29	1,89	34,44	31
VINO 39	Rioja	Vino Tinto	14,36	3,69	4,89	0,58	<0,20	<0,20	19
VINO 40	Rioja	Vino Tinto	15,01	3,78	4,59	0,56	<0,20	<0,20	22
VINO 41	Rioja	Vino Tinto	14,23	3,56	4,76	0,57	<0,20	<0,20	24
VINO 42	Rioja	Vino Tinto	14,15	3,74	5,15	0,66	<0,20	0,32	22
VINO 43	Rioja	Vino Tinto	14,36	3,68	4,82	0,33	<0,20	<0,20	31
VINO 44	Rioja	Vino Blanco	13,05	3,15	5,53	0,28	2,56	<0,20	26
VINO 45	Rioja	Vino Rosado	13,15	3,39	5,15	0,65	2,69	<0,20	25
VINO 46	Rioja	Vino Rosado	13,27	3,51	5,07	0,59	2,05	0,21	20
VINO 47	Rioja	Vino Rosado	13,18	3,43	5,13	0,49	2,13	<0,20	19
VINO 48	Extremadura	Vino Tinto	14,71	3,77	5,37	1,16	<0,20	0,40	18
VINO 49	Ribera Duero	Vino Tinto	13,63	3,79	4,39	0,88	<0,20	0,27	24
VINO 50	Ribera Duero	Vino Tinto	14,43	3,85	4,18	0,54	<0,20	0,31	26

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VINO 51	Ribera Duero	Vino Tinto	14,75	3,92	4,64	0,94	<0,20	0,24	26
VINO 52	Ribera Duero	Vino Tinto	15,15	3,87	4,21	0,64	<0,20	0,27	31
VINO 53	Ribera Duero	Vino Tinto	14,32	3,86	4,87	1,01	<0,20	0,27	26
VINO 54	Rioja	Vino Tinto	15,02	3,77	4,61	0,52	<0,20	0,54	23
VINO 55	Hungría	Vino Blanco	13,24	3,02	7,60	0,36	2,05	1,45	21
VINO 56	Toro	Vino Tinto	15,88	3,97	4,44	0,56	<0,20	0,86	19
VINO 57	Ribera Duero	Vino Tinto	13,79	3,76	4,64	0,47	<0,20	<0,20	8
VINO 58	Navarra	Vino Tinto	14,15	3,70	4,26	0,35	<0,20	<0,20	35
VINO 59	Navarra	Vino Rosado	13,25	3,42	4,98	0,43	1,89	0,35	30
VINO 60	Navarra	Vino Rosado	13,03	3,47	5,26	0,18	2,51	<0,20	37
VINO 61	Navarra	Vino Rosado	12,89	3,36	5,24	0,81	2,15	<0,20	29
VINO 62	Navarra	Vino Rosado	13,10	3,56	5,51	0,63	1,99	0,41	28
VINO 63	Madrid	Vino Tinto	14,20	3,81	4,59	0,72	<0,20	<0,20	20
VINO 64	Priorat	Vino Tinto	15,02	3,78	4,65	0,21	<0,20	<0,20	24
VINO 65	Priorat	Vino Tinto	14,78	3,86	4,68	0,34	<0,20	0,26	29
VINO 66	Rías Baixas	Vino Blanco	13,15	3,15	5,63	0,15	1,96	<0,20	33
VINO 67	Rías Baixas	Vino Blanco	13,22	3,26	5,47	1,01	2,17	<0,20	31
VINO 68	Rías Baixas	Vino Blanco	13,16	3,19	5,59	0,47	2,03	<0,20	30
VINO 69	Rías Baixas	Vino Blanco	13,24	3,23	5,60	0,61	1,93	<0,20	31
VINO 70	Rías Baixas	Vino Blanco	13,09	3,25	5,58	0,58	2,31	<0,20	32
VINO 71	Rías Baixas	Vino Blanco	13,15	3,14	5,64	0,39	1,78	<0,20	35
VINO 72	Ribeiro	Vino Blanco	12,98	3,26	5,36	0,46	2,01	<0,20	24
VINO 73	Ribeiro	Vino Tinto	13,54	3,59	4,87	0,43	<0,20	<0,20	31
VINO 74	Bierzo	Vino Tinto	14,15	3,87	4,53	0,19	<0,20	<0,20	28
VINO 75	La Mancha	Vino Tinto	13,65	3,79	4,15	0,61	<0,20	0,25	30
VINO 76	La Mancha	Vino Tinto	13,74	3,86	4,36	0,70	<0,20	0,36	15
VINO 77	La Mancha	Vino Blanco	12,97	3,26	5,65	0,42	2,17	0,29	32
VINO 78	La Mancha	Vino Blanco Dulce	13,24	3,33	5,49	0,89	2,30	>50	35
VINO 79	Jerez	Vino Blanco Dulce	17,15	3,37	5,53	0,24	1,75	>50	38
VINO 80	Yecla	Vino Tinto	14,08	3,69	4,39	0,56	<0,20	<0,20	19

Tabla 38. Población inicial de microorganismos detectados mediante qPCR (cel/ml) en 45 vinos y 4 mostos procedentes de bodegas comerciales.

MUESTRA	<i>Acetobacter</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus kunkeii</i>	<i>Oenococcus oeni</i>
MOSTO 1	3,3x10 ³	24	53	<10	35
MOSTO 2	4,9x10 ²	7,5x10 ²	<10	<10	<10
MOSTO 3	7,3x10 ²	<10	<10	<10	<10
MOSTO 4	1,0x10 ³	<10	<10	<10	<10
VINO 36	<10	<10	<10	<10	<10
VINO 37	<10	<10	<10	<10	<10
VINO 38	<10	<10	<10	<10	<10
VINO 39	<10	<10	<10	<10	<10
VINO 40	6,9x10 ⁴	3,8x10 ⁴	2,1x10 ⁴	<10	<10
VINO 41	4,3x10 ⁴	4,4x10 ⁴	1,5x10 ⁴	<10	<10
VINO 42	<10	<10	<10	<10	<10
VINO 43	4,5x10 ²	<10		<10	<10
VINO 44	3,8x10 ³			<10	<10
VINO 45	1,3x10 ⁴	1,6x10 ⁶	2,6x10 ⁵		3,4x10 ⁴
VINO 46	1,6x10 ⁴	1,6x10 ⁶	2,7x10 ⁵		1,1x10 ⁴
VINO 47	2,3x10 ³	2x10 ⁶	3,2x10 ⁵		2x10 ⁵
VINO 48	2,4x10 ⁵	<10	2,5x10 ⁵	<10	<10
VINO 49	7,0x10 ³	6,5x10 ²	7,8x10 ²	<10	<10
VINO 50	5,7x10 ²	<10	1,4x10 ⁴	<10	1,0x10 ⁴
VINO 51	2,5x10 ³	<10	1,7x10 ³	<10	1,2x10 ³
VINO 52	4,3x10 ²	<10	2,7x10 ²	<10	4,9x10 ²
VINO 53	3,5x10 ³	<10	1,2x10 ³	<10	1,1x10 ³
VINO 54	1,4x10 ³	<10	7,1x10 ¹	<10	9,0x10 ¹
VINO 55	<10	<10	<10	<10	<10

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VINO 56	$1,7 \times 10^2$	<10	<10	<10	$2,4 \times 10^5$
VINO 57	$9,9 \times 10^4$	$1,3 \times 10^2$	<10	$1,9 \times 10^4$	<10
VINO 58	$2,7 \times 10^2$	-	-	-	-
VINO 59	$3,5 \times 10^2$	-	-	-	-
VINO 60	<10	-	-	-	-
VINO 61	$6,8 \times 10^5$	-	-	-	-
VINO 62	$7,1 \times 10^4$	-	-	-	-
VINO 63	$4,2 \times 10^4$	-	-	-	-
VINO 64	<10	-	-	-	-
VINO 65	<10	-	-	-	-
VINO 66	<10	-	-	-	-
VINO 67	$1,9 \times 10^5$	-	-	-	-
VINO 68	$6,7 \times 10^4$	-	-	-	-
VINO 69	$3,1 \times 10^3$	-	-	-	-
VINO 70	$3,7 \times 10^3$	-	-	-	-
VINO 71	$1,2 \times 10^1$	-	-	-	-
VINO 72	$2,8 \times 10^2$	-	-	-	-
VINO 73	$3,6 \times 10^1$	-	-	-	-
VINO 74	<10	-	-	-	-
VINO 75	$7,8 \times 10^3$	-	-	-	-
VINO 76	$8,0 \times 10^4$	-	-	-	-
VINO 77	$6,9 \times 10^2$	-	-	-	-
VINO 78	$1,5 \times 10^5$	-	-	-	-
VINO 79	<10	-	-	-	-
VINO 80	$3,6 \times 10^4$	-	-	-	-

Tabla 39. Evolución de la concentración (g/l) de ácido acético en el medio de cultivo inoculado con 45 vinos y 4 mostos procedentes de bodegas comerciales. El subrayado en rojo significa el momento en que se detectó el olor a ácido acético en naranja cuando se presentan dudas.

MUESTRA	Ácido Acético									
	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 11	DIA 14
MOSTO 1	0,06			0,32	0,32	0,64	1,97			
MOSTO 2	0,03			0,25	0,25	0,25	0,31	0,4	0,58	0,66
MOSTO 3	0,05			0,16	0,16	0,16	0,3	0,48	0,64	0,84
MOSTO 4	0,02			0,3	0,3	0,3	0,48	0,84	1,18	
VINO 36	0,42			0,43	0,43	0,43	0,41	0,44	0,44	0,44
VINO 37	0,13			0,13	0,13	0,13	0,14	0,14	0,15	0,15
VINO 38	0,12			0,16	0,16	0,16	0,13	0,15	0,18	0,18
VINO 39	0,21			0,24	0,24	0,24	0,25	0,27	0,27	0,28
VINO 40	0,18			0,79	0,96					
VINO 41	0,19			0,68	0,85	1,13				
VINO 42	0,24			0,23	0,25	0,25	0,26	0,25	0,26	0,28
VINO 43	0,11			0,22	0,35	0,68	0,95			
VINO 44	0,10			0,25	0,61	0,86				
VINO 45	0,24			0,41	0,78	0,95				
VINO 46	0,20			0,53	0,89					
VINO 47	0,17			0,32	0,65	0,91				
VINO 48	0,40			0,79	1,15					
VINO 49	0,32			0,45	0,71	0,88				
VINO 50	0,17			0,21	0,29	0,57	0,79	0,98		
VINO 51	0,32			0,45	0,69	0,95				
VINO 52	0,20			0,27	0,42	0,64	0,83			
VINO 53	0,35			0,50	0,71	1,14				
VINO 54	0,16			0,22	0,39	0,64	0,91			
VINO 55	0,10			0,10	0,12	0,12	0,13	0,12	0,15	0,20
VINO 56	0,21			0,27	0,45	0,69	0,93			
VINO 57	0,18			0,61	0,97					
VINO 58	0,13			0,22	0,43	0,58	0,89			
VINO 59	0,15			0,27	0,52	0,71	1,08			
VINO 60	0,08			0,10	0,10	0,11	0,12	0,11	0,12	0,21

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VINO 61	0,28	1,16							
VINO 62	0,21	0,70	0,99						
VINO 63	0,25	0,71	1,25						
VINO 64	0,06	0,08	0,10	0,10	0,09	0,10	0,10	0,13	
VINO 65	0,12	0,11	0,12	0,12	0,15	0,15	0,15	0,17	
VINO 66	0,06	0,08	0,08	0,09	0,10	0,10	0,10	0,21	
VINO 67	0,35	0,81	1,02						
VINO 68	0,15	0,72	0,96						
VINO 69	0,21	0,33	0,58	0,83					
VINO 70	0,22	0,42	0,71	0,93					
VINO 71	0,14	0,14	0,15	0,23	0,39	0,47	0,98		
VINO 72	0,15	0,25	0,41	0,63	0,84				
VINO 73	0,15	0,15	0,17	0,28	0,39	0,53	0,94		
VINO 74	0,07	0,08	0,09	0,10	0,10	0,10	0,14	0,21	
VINO 75	0,20	0,53	0,78	0,94					
VINO 76	0,23	0,71	1,07						
VINO 77	0,14	0,30	0,52	0,79	1,02				
VINO 78	0,31	1,20							
VINO 79	0,08	0,10	0,10	0,10	0,12	0,12	0,15	0,18	
VINO 80	0,20	0,53	0,77	0,95					

El primer dato que llama la atención es la presencia de bacterias de la especie *A. aceti* en los 4 mostos analizados, algo no habitual en este tipo de muestras (Tabla 38). Esta presencia también se había detectado antes (Tabla 29). La explicación podría deberse a que no se trata de mostos recién obtenidos en la bodega para su vinificación, sino de mostos comerciales conservados durante algunos meses en botella. Los mostos analizados presentaron un ligero retraso en la detección olfatométrica del ácido acético respecto de los vinos con concentraciones similares de bacterias acéticas. En los mostos 1 y 4 (10^3 cel/ml) se observó un día de retraso en y en los mostos 3 y 4 (10^2 cel/ml) dos días respecto a los vinos. Estos datos contradicen lo observado en la Tabla 29, donde el desarrollo de las bacterias acéticas fue más rápido al sembrar mostos en el medio de cultivo. La explicación podría estar en la composición fisicoquímica de estos últimos mostos (no analizada). Como se ha indicado, la presencia de bacterias acéticas de la especie *A. aceti* no es habitual en mostos de uva recién procesados, pero probablemente en mostos embotellados para su consumo directo, puedan contribuir también a su deterioro.

Como se puede observar en la tabla 37, alguno de los vinos estudiados (36, 48, 49, 51, 53, 61, 63, 67, 76 y 78) tenían una concentración de ácido acético superior al umbral de detección olfatométrica de este compuesto. No obstante, su posterior dilución (10 ml de vino en 20 ml de medio) en el medio de cultivo hizo que las concentraciones se redujeran por debajo del umbral en el día de inicio del ensayo. Todos estos vinos presentaron poblaciones superiores a 10^3 - 10^4 cels/ml de *Acetobacter*, y en algunos casos, también de otras bacterias (Tabla 38). La única excepción fue el vino 36, que presentaba la mayor concentración de ácido acético (1,26 g/l) y no estaba contaminado con bacterias. En este caso, no se detectó aroma a acético en el medio inoculado con la muestra en las dos semanas que duró el ensayo, lo que indicaría que el desarrollo del aroma a lo largo del tiempo estuvo claramente relacionado con la multiplicación en el medio de microorganismos capaces de producirlo. Esta muestra era un vino oloroso, que de forma natural tienen una acidez volátil más elevada, y en el que no habría riesgo de acetificación posterior por bacterias, como estableció el análisis con el medio diseñado en este trabajo.

En todos los vinos analizados se estableció una correlación clara entre la población inicial de *Acetobacter* y el tiempo en detectar olfatoméricamente el aroma a ácido acético: los vinos con una población inferior a 10 cel/ml no mostraron aroma a ácido acético en los 15 días de ensayo, los que contenían una población entre 10 - 10^3 , 10^3 - 10^4 , 10^4 - 10^5 , y mayor de 10^5 cels/ml tardaron en superar el umbral de detección, 7-8, 6-7, 5-6 y 4-5 días respectivamente.

La presencia de bacterias lácticas junto con *Acetobacter*, no fue relevante en el tiempo de detección, que estuvo determinado por la población de esta última. Esto indicaría que el medio diseñado permite estimar la población aproximada de bacterias acéticas presentes en una muestra en función del tiempo que tarda en detectarse el aroma a ácido acético.

El pH y el grado alcohólico de los vinos (Tabla 39), tampoco fueron relevantes en el desarrollo del aroma a ácido acético. Por ejemplo, al comparar los resultados de los vinos 40 (15% v/v, pH 3,78) y 62 (13,1 % v/v, pH de 3,56), se puede observar que ambos tenían una población similar de *Acetobacter*, $6,9 \times 10^4$ y $7,1 \times 10^4$ cel/ml respectivamente. Las diferencias de dos grados etanol, y dos décimas de pH no influyeron en la detección, ya que ambos vinos dieron positivo a día 5 al sembrarlos en el medio de cultivo líquido.

Tampoco se observó ninguna influencia en el tiempo de detección del tipo de vino (blanco, rosado, tinto, oloroso, dulce) o del origen geográficos de las muestras.

5.10. Protocolo de uso e interpretación de resultados del medio de cultivo diseñado

Con los resultados obtenidos en los apartados 5.6 y 5.9, donde claramente se observa una relación entre la población de bacterias acéticas y el tiempo que se tarda en detectar aroma a ácido acético en el medio, se diseñó una tabla (Tabla 40) para la interpretación de los resultados. Dicha tabla se realizó a partir de una muy similar diseñada por C. Gerland (Intelli'Oeno) para estimar la presencia de *Brettanomyces* en vinos. En la tabla se indica la población estimada de bacterias acéticas presentes en función del tiempo que tarda en desarrollarse el olor a ácido acético, y también qué tratamientos o precauciones se deben aplicar en función del resultado obtenido.

Tabla 40. Estimación de la población de bacterias acéticas en las muestras de vino en función del tiempo necesario para detectar el aroma a ácido acético y recomendaciones de actuación en función del resultado.

DÍAS NECESARIOS PARA LA APARICIÓN DEL OLOR	POBLACIÓN ESTIMADA DE BACTERIAS ACÉTICAS	¿QUÉ HACER?
> 12 días / No aparece	Ausencia en 20 ml	Controlar en 1 mes
10 días	Muy débil (alrededor de 100 bacterias / ml)	Controlar en 15 días
8 días	Débil (100 a 1.000 bacterias / ml)	Controlar dentro de 1 semana
6 – 7 días	Media (1.000 a 10.000 bacterias / ml)	2 controles: inmediato y tras 5 días
4 días	Significativa: Peligro (10.000 a 100.000 bacterias / ml)	ACTUAR: Filtración / Centrifugación / Flash-pasteurización
3 días	Fuerte: Mucho peligro (+ 1.000.000 bacterias / ml)	Añadir SO ₂ Tras unos días volver a controlar

Además, teniendo en cuenta que la evaluación final del medio diseñado se iba a realizar en bodegas comerciales, se diseñaron unas instrucciones sobre el empleo del medio de cultivo (Figura 11), y una ficha (Figura 12), para la toma de datos en las bodegas. Además, se solicitó a cada bodega su valoración sobre su facilidad de uso, eficacia y utilidad.

Protocolo de Uso de Medio Acéticas en Vino



Figura 11. Protocolo de uso del medio de cultivo.

5.11. Estudios en diferentes bodegas del medio de cultivo

Como última etapa del estudio de la idoneidad del medio de cultivo diseñado, se suministró el medio de cultivo líquido a siete bodegas interesadas en su uso, junto con unas sencillas instrucciones sobre su empleo. El objetivo era que las pruebas se hicieran en el entorno y condiciones reales de utilización, y que fueran realizadas por los usuarios finales, que son enólogos y personal de los laboratorios de las bodegas. En las cajas, que contenían 10 botes con el medio de cultivo, se incluyeron dos botes de vidrio con un vino esterilizado en un caso, y el mismo vino contaminado posteriormente con una concentración de 10^4 UFC/ml de *A. aceti*, para que sirvieran de control negativo y positivo respectivamente. En la caja se incluía además una tabla de interpretación de resultados.

Cada bodega lo empleó con sus vinos y dio su opinión sobre los resultados obtenidos y las dificultades de uso. Se marcó con un signo “-” cuando la bodega analizó por olfacción el medio y no detectó el aroma a ácido acético, y con el signo “+” y la celda en color rojo, cuando sí se detectó el aroma.

Los vinos empleados en cada bodega se analizaron en Laboratorios Dolmar Tentamus, tanto el contenido en ácido acético inicial, como la población de bacterias acéticas presentes mediante qPCR específica para el grupo *Acetobacter*.

La bodega número 1 analizó seis de sus vinos con el medio de cultivo. Los resultados obtenidos en la bodega coincidieron con lo que cabría esperar en función de la población inicial de bacterias acéticas (Tabla 41).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 41. Concentración de ácido acético y de bacterias acéticas en el vino inicial, y resultados olfatométricos con distintos vinos de la bodega 1. El subrayado en rojo significa el momento en que se detectó el olor a ácido acético en naranja cuando se presentan dudas. Una casilla en blanco significa que ese día no se analizó.

MUESTRA	Bacterias acéticas cel/ml	Ácido acético Inicial del vino g/l	Olfacción											
			DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 10		
Vino Estéril						-	-			-	-			-
Vino Testigo	1.0×10^4													
Bodega 1 Vino 1	<10	0.41												
Bodega 1 Vino 2	<10	0.47												
Bodega 1 Vino 3	<10	0.35												
Bodega 1 Vino 4	1.3×10^1	0.46												
Bodega 1 Vino 5	<10	0.68												
Bodega 1 Vino 6	3.8×10^3	0.55												

El vino testigo con una concentración de 10^4 cel/ml, debería dar positivo al cabo de cuatro días según la tabla 40, y el resultado de la bodega fue el esperado. Solamente dos vinos de la bodega presentaron bacterias acéticas, el vino 4 y el vino 6. El primero, contenía una población de bacterias de 10^1 cel/ml, por lo que teóricamente debería dar positivo los días 10-11, y ese fue el resultado de la bodega. Por otra parte, el vino 6 presentaba una concentración de 10^3 cel/ml que debería dar positivo los días 6-7, pero a la bodega le costó más tiempo detectarlo, aunque el día 7 ya se percibió un olor dudoso. En opinión de la bodega el medio fue sencillo de utilizar, y con un poco de entrenamiento el olor era fácil de detectar.

En los resultados de la bodega 2 (Tabla 42), se observa que hubo dos días donde no se realizó la olfacción, probablemente por ser fin de semana. Ello retrasó la detección positiva del vino testigo dos días, ya que al tener una concentración de 10^4 cel/ml, debería haber dado positivo a día cuatro. En este caso, tres vinos de la bodega presentaron bacterias acéticas. El vino 4, con una concentración de 10^3 cel/ml, dio positivo el día 6, como se esperaba. Sin embargo, en los vinos 2 y 8 con concentraciones del orden de 10^1 cel/ml, que deberían haber dado positivo entre los días 10-11, no se llegó a detectar el olor a ácido acético probablemente porque el ensayo se interrumpió el día 10.

En opinión de los técnicos de esta bodega, el test era sencillo de utilizar, pero el olor no fue fácil de detectar, no era un olor claro, y precisaría de un mayor entrenamiento.

Tabla 42. Concentración de ácido acético y de bacterias acéticas en el vino inicial, y resultados olfatométricos con distintos vinos de la bodega 2. El subrayado en rojo significa el momento en que se detectó el olor a ácido acético en naranja cuando se presentan dudas. Una casilla en blanco significa que ese día no se analizó.

MUESTRA	Bacterias acéticas cel/ml	Ácido acético Inicial del vino g/l	Olfacción										
			DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 10	
Vino Estéril			-	-	-				-	-	-	-	-
Vino Testigo	1.0 x 10 ⁴		-	-	-				+	+	+	+	+
Bodega 2 Vino 1	<10	0.91	-	-	-				-	-	-	-	-
Bodega 2 Vino 2	2.3 x 10 ¹	0.86	-	-	-				-	-	-	-	-
Bodega 2 Vino 3	<10	0.85	-	-	-				-	-	-	-	-
Bodega 2 Vino 4	8.7 x 10 ³	0.96	-	-	-				+	+	+	+	+
Bodega 2 Vino 5	<10	0.88	-	-	-				-	-	-	-	-
Bodega 2 Vino 6	<10	0.72	-	-	-				-	-	-	-	-
Bodega 2 Vino 7	<10	0.84	-	-	-				-	-	-	-	-
Bodega 2 Vino 8	1.1 x 10 ¹	0.85	-	-	-				-	-	-	-	-

En la bodega 3, tanto en el vino testigo como sus propias muestras, la siembra en el medio diseñado permitió detectar o no la presencia de bacterias acéticas en el tiempo previsto para las concentraciones determinadas por qPCR (Tabla 43). Dos vinos de la bodega presentaron bacterias acéticas, el vino 2 una concentración de 10⁵ cel/ml, y dio positivo el día 4, y el vino 3 con una concentración de 10³ cel/ml y fué positivo el día 6. En opinión de la bodega, el medio fue sencillo de usar, pero el olor no fue fácil de detectar porque no era un olor claro, por lo que precisaría de un mayor entrenamiento.

Tabla 44. Concentración de ácido acético y de bacterias acéticas en el vino inicial, y resultados olfatométricos con distintos vinos de la bodega 4. El subrayado en rojo significa el momento en que se detectó el olor a ácido acético en naranja cuando se presentan dudas. Una casilla en blanco significa que ese día no se analizó.

MUESTRA	Bacterias acéticas cel/ml	Ácido acético Inicial del vino g/l	Olfacción										
			DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 11	
Vino Estéril			-			-	-	-	-	-			-
Vino Testigo	1.0 x 10 ⁴		-			-	+	+	+	+			+
Bodega 4 Vino 1	1.7 x 10 ⁵	0.75	-			-	+	+	+	+			+
Bodega 4 Vino 2	<10	0.32	-			-	-	-	-	-			-
Bodega 4 Vino 3	6.0 x 10 ⁴	0.69	-			-	-	+	+	+			+
Bodega 4 Vino 4	<10	0.41	-			-	-	-	-	-			-
Bodega 4 Vino 5	2.8 x 10 ²	0.50	-			-	-	-	-	-	+		+

En la bodega 5 se analizaron siete vinos con el medio de cultivo, cinco de los cuales contenían bacterias acéticas (Tabla 45). Los resultados obtenidos, salvo en el caso del vino 5, se retrasaron un día respecto a lo esperado, incluido el vino testigo. El vino 2 (10⁵ cel/ml) debería haber dado positivo el día 1 y lo hizo un día después. El vino 3 (10¹ cel/ml) teóricamente debería haber dado positivo el día 10 – 11, y pasados 11 días siguió sin dar positivo. El vino 4 debería haber sido positivo el día 4, pero no se detectó olor a ácido acético hasta el día 7. Finalmente, el vino 7 (10³ cel/ml) que debería haber sido positivo el día 6, lo fue el día siete. En opinión de la bodega el medio fue sencillo de usar, el olor no fue fácil de detectar porque no fue un olor claro y se precisaría de un mayor entrenamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 45. Concentración de ácido acético y de bacterias acéticas en el vino inicial, y resultados olfatométricos con distintos vinos de la bodega 5. El subrayado en rojo significa el momento en que se detectó el olor a ácido acético en naranja cuando se presentan dudas. Una casilla en blanco significa que ese día no se analizó.

MUESTRA	Bacterias acéticas cel/ml	Ácido acético Inicial del vino g/l	Olfacción										
			DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 11	
Vino Estéril			-			-	-	-	-	-	-	-	-
Vino Testigo	1.0×10^4		-			-		+	+	+	+		+
Bodega 5 Vino 1	<10	0.47	-			-	-	-	-	-	-	-	-
Bodega 5 Vino 2	8.2×10^5	0.82	-			-		+	+	+	+		+
Bodega 5 Vino 3	6.7×10^1	0.51	-			-	-	-	-	-	-	-	-
Bodega 5 Vino 4	1.2×10^4	0.87	-			-	-	-	+	+			+
Bodega 5 Vino 5	4.7×10^2	0.71	-			-	-	-	-	+			+
Bodega 5 Vino 6	<10	0.49	-			-	-	-	-	-	-	-	-
Bodega 5 Vino 7	9.1×10^3	0.68	-			-	-	-	+	+			+

La bodega 6 analizó cuatro de sus vinos con el medio de cultivo (Tabla 46). Sólo en el caso del vino 2 (10^3 cel/ml), los resultados coincidieron con lo esperado. Tanto en el vino testigo como en los vinos 1 (1.7×10^5 cel/ml) y 3 (2.7×10^4 cel/ml) se produjo un día de retraso en la detección, y en el vino 4 (10^2 cel/ml) un día de adelanto. En opinión de los técnicos de esta bodega, el medio fue sencillo de usar y el olor fue fácil de detectar.

Tabla 46. Concentración de ácido acético y de bacterias acéticas en el vino inicial, y resultados olfatométricos con distintos vinos de la bodega 6. El subrayado en rojo significa el momento en que se detectó el olor a ácido acético en naranja cuando se presentan dudas. Una casilla en blanco significa que ese día no se analizó.

MUESTRA	Bacterias acéticas cel/ml	Ácido acético Inicial del vino g/l	Olfacción										
			DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 11	
Vino Estéril			-			-	-	-	-	-	-	-	-
Vino Testigo	1.0 x 10 ⁴		-			-	+	+	+	+			+
Bodega 6 Vino 1	1.7 x 10 ⁵	0.90	-			-	+	+	+	+			+
Bodega 6 Vino 2	4.3 x 10 ³	0.81	-			-	-	+	+	+			+
Bodega 6 Vino 3	2.7 x 10 ⁴	0.93	-			-	+	+	+	+			+
Bodega 6 Vino 4	6.0 x 10 ²	0.74	-			-	-	-		+	+		+

La bodega 7 analizó diez de sus vinos con el medio de cultivo (Tabla 47). Todos los vinos, excepto el testigo y el vino 3, que tardaron dos días más de lo esperado en la detección, dieron positivo el día previsto. Al igual que ocurrió en la bodega 6, los resultados de la bodega 7 indican que los resultados son acordes con lo esperado en muestras con poblaciones de bacterias acéticas inferiores a 10³ cel/ml, y se requirieron 1-2 días más para obtener un resultado positivo en muestras con poblaciones más altas. En opinión del personal de esta bodega, el medio fue sencillo de usar, pero el olor no fue fácil de detectar y se precisaría de un mayor entrenamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 47. Concentración de ácido acético y de bacterias acéticas en el vino inicial, y resultados olfatométricos con distintos vinos de la bodega 7. El subrayado en rojo significa el momento en que se detectó el olor a ácido acético en naranja cuando se presentan dudas. Una casilla en blanco significa que ese día no se analizó.

MUESTRA	Bacterias acéticas cel/ml	Ácido acético Inicial del vino g/l	Olfacción												
			DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5	DIA 6	DIA 7	DIA 8	DIA 9	DIA 11			
Vino Estéril			-			-	-	-	-	-					
Vino Testigo	1.0 x 10 ⁴		-			+?	+?	+	+	+					+
Bodega 7 Vino 1	<10	0.35	-			-	-	-	-	-					-
Bodega 7 Vino 2	<10	0.41	-			-	-	-	-	-					-
Bodega 7 Vino 3	8.5 x 10 ⁴	0.82	-			+?	+?	+	+	+					+
Bodega 7 Vino 4	2.7 x 10 ³	0.69	-			-	-	+	+	+					+
Bodega 7 Vino 5	<10	0.27	-			-	-	-	-	-					-
Bodega 7 Vino 6	9.3 x 10 ⁵	0.89	-			+	+	+	+	+					+
Bodega 7 Vino 7	1.8 x 10 ³	0.74	-			-	-	-	+	+					+
Bodega 7 Vino 8	8.5 x 10 ²	0.63	-			-	-	-	+?	+					+
Bodega 7 Vino 9	2.3 x 10 ¹	0.57	-			-	-	-	-	-					+
Bodega 7 Vino 10	5.7 x 10 ³	0.66	-			-		+?	+?	+	+				+

Los mismos vinos utilizados por las bodegas fueron sembrados en el medio de cultivo en Laboratorios Dolmar y analizados olfatométricamente en dicho laboratorio, donde el tiempo de detección no se desvió de lo estipulado previamente. Por todo ello, se constató la necesidad de realizar un pequeño entrenamiento para mejorar el umbral de percepción olfativo de manera previa a la utilización del medio de cultivo por personal no habituado.

CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

- 1- La secuenciación masiva aplicada a la identificación y cuantificación de bacterias acéticas en los vinos resultó ser una herramienta útil, pero a día de hoy de difícil empleo en las bodegas.
- 2- Los medios de cultivo sólidos disponibles para analizar la presencia de bacterias acéticas en vinos no fueron capaces de detectar la presencia de estos microorganismos en bajas concentraciones.
- 3- Se ha diseñado un medio de cultivo líquido que es válido para cuantificar de forma aproximada las bacterias acéticas presentes en el vino mediante olfatometría.
- 4- La elevada presencia de otros microorganismos acompañantes de las bacterias acéticas en las muestras de vino, ralentizó la producción de ácido acético por parte de las bacterias acéticas, lo que distorsionó ligeramente los resultados utilizar el medio diseñado.
- 5- El medio de cultivo líquido fue realmente útil para estimar el riesgo de “picado acético” durante la conservación de un vino.
- 6- El método de detección de bacterias acéticas diseñado es sencillo, barato, fácil de usar por personal no cualificado, se puede conservar durante varios meses en condiciones de refrigeración a 4°C, y puede ser empleado sin grandes infraestructuras, simplemente contando con una estufa y un frigorífico.
- 7- Se recomienda un entrenamiento previo para la correcta detección del ácido acético por olfacción por parte del personal no experimentado.

BIBLIOGRAFÍA



7. BIBLIOGRAFÍA

- Andrés-Barrao, C., Benagli, C., Chappuis, M., Ortega Pérez, R., Tonolla, M., Barja, F. Rapid identification of acetic acid bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology*, 36 (2013) 75-81. DOI 10.1016/j.syapm.2012.09.002
- Bartlett J.M.S., Stirling D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. PCR Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 226 (2003). Humana Press. DOI 10.1385/1-59259-384-4:3
- Bartowsky,E.J.P., Henschke, A. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine. A review. *International Journal of Food Microbiology*, 125 (2008) 60-70. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.016
- Bartowsky, E.J., Xia, D., Gibson, R.L., Fleet, G.H., Henschke, P.A. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 36 (2003) 307-314. DOI 10.1046/j.1472-765x.2003.01314.x
- Blättel, V.; Wirth, K.; Claus, H.; Schlott, B.; Pfeiffer, P.; König, H. A. Lytic Enzyme Cocktail from *Streptomyces* Sp. B578 for the Control of Lactic and Acetic Acid Bacteria in Wine. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009, 83 (5), 839–848. DOI 10.1007/s00253-009-1926-7
- Blouin, J., Peynaud, E. *Enología práctica: Conocimiento y elaboración del vino* (2003). ISBN 84-8476-160-6.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L. *Teoría y práctica de la elaboración del vino* (2002). ISBN 978-84-200-0978-0.
- Carrau, F., Bodoia, E., Ramey, D. Yeasts for low input winemaking: Microbial terroir and flavor differentiation. *Advances in Applied Microbiology*, 111 (2020) Chapter 3. DOI 10.1016/bs.aams.2020.02.001
- Código internacional de prácticas enológicas. OIV/2019
- Comas-Riu J., Rius N. Flow cytometry applications in the food industry. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36 (2009) 999-1011. DOI 10.1007/s10295-009-0608-x
- Considine, J.A., Frankish, E. A complete guide to Quality in small-scale wine making. *Microbiology and methods*, 6 (2014) 79-95. ISBN 978-0-12-408081-2.
- Couto, J.A., Barbosa, A. Hogg, T. A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces/Dekkera* in wines. *Letters in Applied Microbiology*, 41 (2005) 505-510. DOI 10.1111/j.1472-765X.2005.01782.x
- Davis, C.R., Wibowo, D.J., Eschenbruch, R.E., Lee, T.H., Fleet, G.H. Practical implications of malolactic fermentation: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36 (1985) 290–301. DOI 10.5344/ajev.1985.36.4.290

- De Ley, J., Gillis, M., Swings, J. Family VI. Acetobacteraceae. In N. R. Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1 (1984) 267–278. Williams y Wilkins, Baltimore. ISBN 978-0-387-24145-6
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., Prust, C. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 60-3 (2002) 233-42. DOI 10.1007/s00253-002-1114-5
- Ercolini, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*. 56 (2004) 297-314. DOI 10.1016/j.mimet.2003.11.006
- Etievant, P. Volatile Compounds in Food and Beverage. *Maarse, H.* 14 (1991) 483–533. DOI 10.1201/9780203734285
- ETS laboratoires. California. Scorpion genetic testing for spoilage organisms.
- Freer, S.N. Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18 (2002) 271-275. DOI 10.1023/A:1014927129259
- Fundación para la Cultura del Vino. Bacterias lácticas y fermentación maloláctica. En informe Técnico III. Encuentro Enológico; “Fermentación Maloláctica”. Madrid 15 marzo 2006. 22-29.
- Garijo, P., López, R., Santamaría, P., Ocón, E., Olarte, C., Sanz, S., Gutiérrez, A.R. Presence of lactic bacteria in the air of a winery during the vinification period. *International Journal of Food Microbiology*. 136-1 (2009) 142-146. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.018
- Gil-Sánchez, I.; Suáldea, B. B.; Moreno-Arribas, M. V. Chapter 6 -Malolactic Fermentation. In *Red Wine Technology*; Morata, A., Ed.; Academic Press,2019; pp.85–98. DOI 10.1016/B978-0-12-814399-5.00006-2
- Gilbert, J.A., van der Lelie, D., Zorraonandia, I. Microbial terroir for wine grapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111 (2014) 5-6. DOI 10.1073/pnas.1320471110
- Giudici, P., Zambonelli, C. Biometric and genetic study on acetic acid production for breeding of wine yeast. *American Journal of Enology and Viticulture*. 43 (1992) 370-374. DOI 10.5344/ajev.1992.43.4.370
- González-Arenzana, L., López, R., Santamaría, P., López-Alfaro, I. Dynamics of Lactic Acid Bacteria Populations in Rioja Wines by PCR-DGGE, Comparison with Culture-Dependent Methods. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97-15 (2013) 6931–6941. DOI 10.1007/s00253-013-4974-y
- Guillamón, J.M., González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested PCR *Microbiological Letters*. 254 (2006) 123-128. DOI 10.1111/j.1574-6968.2005.000011.x
- Guillamón, J.M., Mas, A. Acetic Acid Bacteria. *Molecular Wine Microbiology*. Chapter 9 (2011). DOI 10.1016/B978-0-12-375021-1.10009-8

- Gutiérrez Linares, A. Nitrogen metabolism in wine yeast during alcoholic fermentation: effect on growth, fermentation activity and aroma production. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. 2013
- Harwood, G. Microbiology and chemistry of corks taints in wine. In G.H. Fleet (ed) Wine microbiology and biotechnology. In G.H. Fleet (ed) Academic Publishers, Chur, Switzerland. 353-372. ISBN 0415278503
- Hidalgo, C.; Vegas, C.; Mateo, E.; Tesfaye, W.; Cerezo, A. B.; Callejón, R. M.; Poblet, M.; Guillamón, J. M.; Mas, A.; Torija, M. J. Effect of Barrel Design and the Inoculation of *Acetobacter Pasteurianus* in Wine Vinegar Production. *Int J Food Microbiol* 2010, 141 (1–2), 56–62. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.018
- Hidalgo, J. Tratado de Enología. Tomos I y II. (2003). Mundi-Prensa. Madrid. ISBN 8484767515
- Janagama, H.K., Mai, T., Han, S., Nadala, L., Nadala, C., Samadpour, M. Simultaneous detection of multiple wine-spoilage organisms using a PCR-based DNA dipstick assay. *Journal of AOAC international* 102-2 (2019). DOI 10.5740/jaoacint.18-0144
- Jara Campos, C.I. Desarrollo de métodos de biología molecular para el análisis directo de bacterias acéticas de vinagre. Tesis doctoral. Universitat Rovira i Virgili (2009). ISBN:978-84-692-3226-2/DL:T-918-2009
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., Ribéreau-Gayon, P. Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology*. 48-1 (1984) 153-156. DOI 10.1128/aem.48.1.153-156.1984
- Kantor, A., Kacaniova, M., Pochop, J., Petrova, J., Hleba, L., Felsociova, S., Pavelkova, A., Rovna, K., Bobkova, A. Lactic acid and acetic acid bacteria isolated from red wine. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2 (2013) 1704-1715. Retrieved from <https://office2.jmbfs.org/index.php/JMBFS/article/view/7265>
- Kim, D.H., Chon, J.W., Kim, H., Seo, K.H. Development of a novel selective medium for the isolation and enumeration of acetic acid bacteria from various foods, *Food Control* (2019). DOI 10.1016/j.foodcont.2019.106717
- Kirioglou, D., Lleixa, J., Mas, A., Portillo, M.C. Massive sequencing: A new tool for the control of alcoholic fermentation in wine? *Fermentation* (2018) 4 (7). DOI 10.3390/fermentation4010007
- Lappa, I.K., Kachrimanidou, V., Pateraki, C., Koulougliotis, D., Eriotou, E., Kopsahelis, N. Indigenous yeasts: emerging trends and challenges in winemaking. *Current Opinion in Food Science*. 32 (2020) 133-143. DOI 10.1016/j.cofs.2020.04.004
- Liu, Y., Lu, Y., Sun, F., Wang, W., Wang, J., Sun, J., Mu, J., Gao, Z. Effects of spontaneous fermentation on the microorganisms diversity and volatile compounds during 'Marselan' from grape to wine. *LWT- Food Science and Technology*, 134 (2020) 110-193. DOI 10.1016/j.lwt.2020.110193

- Longin, C., Petitgonnet, C., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., Alexandre, H. Application of flow cytometry to wine microorganisms. *Food Microbiology*. 62 (2017) 221-231. DOI 10.1016/j.fm.2016.10.023
- Longobardi-Givan, A. *Flow Cytometry: First Principles*. (2001). Second ed. John Wiley & Sons, New York. ISBN 9780471382249
- Lonvaud-Funel, A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Anton Leeuw*. 76-1-4 (1999) 317-331. DOI 10.1023/A:1002088931106
- López, V., Fernández-Espinar, M.T., Barrio, E., Ramón, D., Querol, A. A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 81 (2003) 63-71. DOI 10.1016/s0168-1605(02)00194-0
- Mabel Gerard, L. Caracterización de bacterias del ácido acético destinadas a la producción de vinagres de frutas. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia (2015).
- Mas, A., Torija, M.J., González, A., Poblet, M., Guillamón, J.M. Acetic acid bacteria in oenology. *Contributions to Science*. 3-4 (2007). DOI 10.2436/20.7010.01.27
- Melo, J. *Microbiology of Vinegar: from Isolation, Phenetic Characterization and Detection of Acetic Acid Bacteria to Microbial Profiling of an Industrial Production*. Master Microbiología. (2016). Instituto Superior Técnico Lisboa.
- Mesas, J.M., Alegre, M.T. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 2-4 (1999) 174-183. DOI 10.1080/11358129909487599
- Millet, V., Lonvaud-Funel, A. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters of Applied Microbiology*. 30 (2000) 136-141. DOI 10.1046/j.1472-765x.2000.00684.x
- Morata, A., Bañuelos, M.A., López, C., Chenli, S., Vejarano, R., Loira, I., Palomero, F., Lepe, J.A.S. The oenological interest of fumaric acid: Stop malolactic fermentation and preserve the freshness of wines. *BIO Web of Conferences* 15, 02034 (2019). DOI 10.1051/bioconf/20191502034
- Organización Internacional de la Vid y el Vino. Actualidad de la coyuntura del sector vitivinícola mundial en 2020.
- Parra, A., Escribano-Viana, R., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R., González-Arenzana, L. Diversidad microbiana de vinos tintos deteriorados durante su conservación. *La Semana Vitivinícola*. 3563 (2020) 356-360. ISSN 0037-184X
- Pedraza, R. O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125-1 (2008) 25-35. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.079
- Pérez-Martín, F.; Seseña, S.; Izquierdo, P. M.; Palop, M. L. Are *Enterococcus* Populations Present during Malolactic Fermentation of Red Wine Safe? *Food Microbiol* 2014, 42 (0), 95–101. DOI 10.1016/j.fm.2014.03.001

- Portillo, M.C., Mas, A. Analysis of microbial diversity and dynamics during wine fermentation of grenache grape variety by High-Throughput Barcoding Sequencing. *LWT – Food Science Technology*. 72 (2016) 317-321. DOI 10.1016/j.lwt.2016.05.009
- Pretorius, I.S. Tasting the terroir of wine yeast innovation. *FEMS Yeast Research*. 20-1 (2020). DOI 10.1093/femsyr/foz084
- Ramey, D. In Stockley, C.S., Johnstone, R.S. Low input winemaking – Let nature do the work. Lee, T.H., Sas, A.N. (Eds). *Proceedings Australian wine industry technical conference*. Adelaide, Australia. 26-29.
- Raspor, P., Goranovic, D. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*. 28, 101-124. DOI 10.1080/07388550802046749
- Recasens, M. Economía vitivinícola en el siglo XXI. *ACE Revista de Enología*. (Julio 2003).
- Renouf, V., Strehaiano, P., Lonbaud, A. Yeast and bacteria analysis of grape, wine and cellar equipments by PCR-DGGE. *Journal International Science Vigne et Vin*. 41-1 (2007) 51-61. DOI 10.20870/oenone.2007.41.1.858
- Resolución OIV/OENO 206/2010.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. *Handbook of enology. The microbiology of Wine and Vinifications. Vol.I* (2000). Wiley. West Sussex. England. ISBN-13: 978-0-470-01034-1
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. *Tratado de Enología. Microbiología del vino*. (2003) Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires. Argentina. ISBN 9505045719
- Rodrigues, N., Gonçalves, G., Pereira-da-Silva, S., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera/Brettanomyces*. *Journal of Applied Microbiology*. 90 (2001) 588-599. DOI 10.1046/j.1365-2672.2001.01275.x
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*. 73 (1992) 126-130. DOI 10.1111/j.1365-2672.1992.tb01698.x
- Saez, J.S., Lopes, C.A., Kirs, V.E., Sangorrín, M. Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. *Food Microbiology*. 28-3 (2011) 503-509. DOI 10.1016/j.fm.2010.10.019
- Savazzini, F., Martinelli, L. DNA analysis in wines: Development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification. *Analytica Chimica Acta*. 563 (2006) 274-282. DOI 10.1016/j.aca.2005.10.078
- Simpson, R.F., Capone, D.L., Sefton, M.A. Isolation and Identification of 2-Methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a potent musty compound from wine corks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (2004) 5425-5430. DOI 10.1021/jf049484z

- Tamagnini, Paraje. ¿Qué son las bacterias viables no cultivables? (revisión bibliográfica). Revista Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 2-2 (2015) 99-102. <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/FCEFYN/article/view/10745>
- Du Toit, W.J., Marais, J., Pretorius, I.S., du Toit, M. Oxygen in Must and Wine: A Review. South African Journal of Enology and Viticulture. 27-1 (2006) 76-93. DOI 10.21548/27-1-1610
- Trček, J., Barja, F. Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. International Journal of Food Microbiology. 196 (2015) 137-44. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.003
- Ultee, A., Wacker, A., Kunz, D., Löwenstein, R., König, H. Microbial Succession in Spontaneously Fermented Grape Must Before, During and After Stuck Fermentation. South African Journal of Enology and Viticulture. 34-1 (2013) 68-78. DOI 10.21548/34-1-1082
- Vallet-Courbin, A., Lucas, M., Dutilh, L., Miot-Sertier, C., Windholtz, S., Lucas, P., Masneuf-Pomarede, I., Maupeu, J. Identification of enological yeasts and bacteria by MALDI-TOF mass spectrometry. IVES Technical Reviews. 2022. DOI 10.20870/IVES-TR.2022.5534
- Vidra, A., Németh, A. Bio-produced acetic acid: a review. Periodica Polytechnica Chemical Engineering. 62-3 (2018) 245-256. DOI 10.3311/PPCh.11004
- Vilela, A. Biological demalication and deacetification of musts and wines: Can wine yeasts make the wine taste better? Fermentation. 3-51 (2017). DOI 10.3390/fermentation3040051
- Vilela, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., Côte-Real, M. Reduction of volatile acidity of acidic wines by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. Applied Microbiology Biotechnology. 97 (2013) 4991-5000. DOI 10.1007/s00253-013-4719-y
- Vilela-Moura, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., Silva, R.D., Chaves, S.R., M.J.Sousa, M.Côte-Real. The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine Quality: reduction of volatile acidity of grape musts and wines. Applied Microbiology Biotechnology. 89 (2011) 271-280. DOI 10.1007/s00253-010-2898-3
- Wade, M. E.; Strickland, M. T.; Osborne, J. P.; Edwards, C. G. Role of *Pediococcus* in Winemaking. Australian Journal Grape Wine Res 2018. DOI 10.1111/ajgw.12366
- Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J. The challenge of *Brettanomyces* in wine. LWT- Food Science and Technology. 43 (2010) 1474-1479. DOI 10.1016/j.lwt.2010.06.010
- www.cepheid.com
- Yamada, Y., Yukphan, P. Genera and species in acetic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology. 125 (2008) 15-24. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.077
- Zgardan, D., Mitina, I., Mitin, V., Behta, E., Rubtov, S., Boistean, A., Munteanu, M. Acetic Acid Bacteria Detection in Wines by REAL-TIME PCR. Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry. 23-2 (2022) 179-188. ISSN 1582-540X

Zhang, J., Plowman, J.E., Tian, B., Clerens, S., On, S.L.W. Predictive potential of MALDI-TOF analyses for wine and brewing yeasts. *Microorganisms*. 10 (2022) 265. DOI 10.3390/microorganisms10020265