



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Identificación taxonómica y clonal de bacterias acéticas, y estudio del efecto de la nisina frente a biofilms de bacterias enológicas
Autor/es
Rocio Fernández Pérez
Director/es
Fernanda Ruiz Larrea
Facultad
Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico
2014-2015

Existen circunstancias excepcionales que impiden la difusión de la versión íntegra de esta tesis. Por este motivo se difunden únicamente los contenidos que no están sujetos a confidencialidad



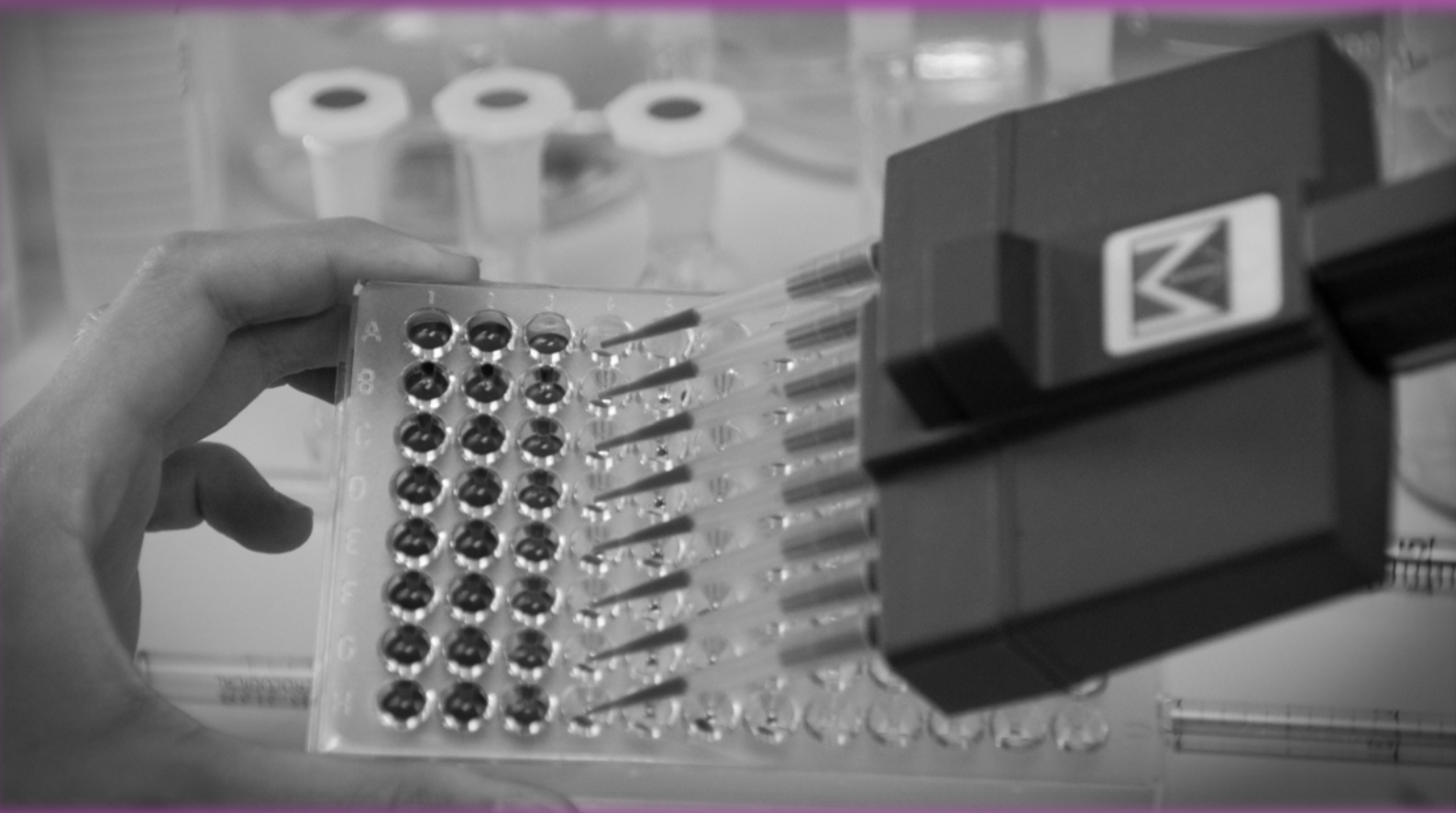
Identificación taxonómica y clonal de bacterias acéticas, y estudio del efecto de la nisina frente a biofilms de bacterias enológicas, tesis doctoral de Rocio Fernández Pérez, dirigida por Fernanda Ruiz Larrea (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor
© Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2016
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es
ISBN 978-84-617-5277-5



*Identificación taxonómica y clonal de bacterias
acéticas, y estudio del efecto de la nisina frente a
biofilms de bacterias enológicas*

*Clonal and taxonomic identification of acetic acid
bacteria, and study of the effect of nisin against
oenological bacterial biofilms*



Rocío Fernández Pérez

Tesis Doctoral con Mención Internacional

Logroño 2015



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

Departamento de Agricultura y Alimentación

Área de Bioquímica y Biología Molecular

TESIS DOCTORAL

Identificación taxonómica y clonal de bacterias acéticas, y estudio del efecto de la nisina frente a biofilms de bacterias enológicas

.....

Clonal and taxonomic identification of acetic acid bacteria, and study of the effect of nisin against oenological bacterial biofilms

Memoria presentada por **ROCÍO FERNÁNDEZ PÉREZ** para optar al título de Doctora con la Mención Internacional por la Universidad de La Rioja.

Logroño, Mayo de 2015.



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

Departamento de Agricultura y Alimentación
Área de Bioquímica y Biología Molecular

M^a FERNANDA RUIZ LARREA, Profesora Catedrática del área de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja,

Por la presente declara que,

Dña. ROCÍO FERNÁNDEZ PÉREZ, Licenciada en Química y Enología, ha realizado dentro del Programa de Doctorado de Enología el trabajo de tesis doctoral titulado "Identificación taxonómica y clonal de bacterias acéticas, y estudio del efecto de la nisina frente a biofilms de bacterias enológicas", desarrollado bajo su dirección en los laboratorios del Departamento de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja, y que reúne las condiciones exigidas para optar al título de Doctor así como a la Mención de Doctor Internacional.

Lo que hace constar en Logroño, a 26 de mayo de 2015.

Fdo.: M^a Fernanda Ruiz Larrea



Índice

Index

ÍNDICE / INDEX

Abreviaturas / Abbreviations.....	i
Lista de Tablas / List of Tables	vii
Lista de Figuras / List of Figures.....	ix

RESUMEN	xiii
SUMMARY	xv

INTRODUCCIÓN / INTRODUCTION

1. BACTERIAS ENOLÓGICAS.....	1
1.1. La microbiota del vino	1
1.2. Las bacterias lácticas y la fermentación maloláctica del vino.....	4
1.3. Las bacterias acéticas	7
1.4. Formación de biofilms bacterianos.....	9
1.5. Resistencia del biofilm.....	13
2. LA BACTERIOCINA NISINA	14
2.1. Definición y clasificación de las bacteriocinas de bacterias lácticas	14
2.2. Nisina: características y estructura	17
2.3. Biosíntesis y producción de nisina	18
2.4. Modo de acción de la nisina.....	22
2.5. Aplicación de la nisina en la industria alimentaria	24
2.6. Metabolismo de la arginina en <i>Lactococcus lactis</i>	26
2.7. Ruta ADI de degradación de la arginina	27

3. BACTERIAS ACÉTICAS	30
3.1. Las bacterias acéticas y el vinagre	30
3.2. Taxonomía de las bacterias acéticas	32
3.3. Técnicas de identificación de bacterias acéticas	36
3.3.1. Técnicas de identificación taxonómica de bacterias acéticas.....	36
3.3.2. Técnicas de identificación de bacterias acéticas a nivel clonal.....	37
OBJETIVOS	41
OBJECTIVES	42

MATERIALES Y MÉTODOS / MATERIALS AND METHODS

1. MEDIOS Y METODOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS LÁCTICAS Y ACÉTICAS	43
1.1. Medios y condiciones de cultivo de bacterias acéticas.....	43
1.2. Medios y condiciones de cultivo de bacterias lácticas	43
1.3. Monitorización del crecimiento de bacterias lácticas.....	45
2. CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA Y CLONAL DE BACTERIAS ACÉTICAS DEL VINAGRE	46
2.1. Toma de muestras de vinagre	46
2.2. Cepas modelo de bacterias acéticas utilizadas en el estudio	47
2.3. Cultivo de las muestras de vinagre	48
2.4. Recuento de bacterias viables y totales mediante el método rápido de microscopía de fluorescencia.....	49
2.5. Validación del método de microscopía de fluorescencia con bacterias lácticas en condiciones enológicas.....	50
2.6. Identificación taxonómica a nivel de especie	51
2.6.1. Extracción de DNA, amplificación por PCR e identificación taxonómica	51
2.6.2. Análisis informático de secuencias de DNA.....	52

2.7. Identificación clonal mediante ERIC-PCR.....	52
2.8. Identificación clonal mediante análisis de restricción con la enzima <i>SpeI</i> y electroforesis de campos pulsados.....	53
2.9. Estudio de reproducibilidad y análisis numérico de las imágenes obtenidas en las técnicas ERIC-PCR y PFGE	56
3. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LAS BACTERIAS PARA FORMAR BIOFILM.....	57
3.1. Cepas para el estudio de la capacidad de formación de biofilm.....	57
3.2. Método para la determinación de la capacidad formadora de biofilm de bacterias lácticas	58
3.3. Método para la determinación de la capacidad formadora de biofilm de bacterias acéticas	59
3.4. Visualización del biofilm al microscopio.....	60
3.5. Estudio de la tolerancia de las bacterias lácticas al etanol y a la nisina	61
3.6. Formación de biofilms de bacterias lácticas en presencia de etanol y de nisina	62
3.7. Tolerancia al etanol y a la nisina de biofilms de bacterias lácticas previamente formados.....	62
4. PRODUCCIÓN DE NISINA EN CONDICIONES ENOLÓGICAS Y EFECTO SOBRE LAS BACTERIAS	64
4.1. Cepas utilizadas para el estudio de la producción de nisina y sensibilidad a la nisina	64
4.2. Métodos para la determinación de la actividad antimicrobiana	65
4.2.1. Técnica de microtiter	65
4.2.2. Técnica de difusión en agar.....	66
4.3. Estudio de la producción de nisina por la cepa <i>L. lactis</i> LM29	66
4.3.1. Estudio del crecimiento de <i>L. lactis</i> LM29 y su producción de nisina en MRS con mosto de uva blanca	67
4.3.2. Estudio del crecimiento de <i>L. lactis</i> LM29 y su producción de nisina en MRS con etanol	67

4.3.3. Estudio del crecimiento de *L. lactis* LM29 y su producción de nisina en MRS con mosto y etanol..... 68

4.3.4. Obtención de un extracto activo de nisina de grado enológico 69

5. METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS DE *Lactococcus lactis* EN PRESENCIA DE ETANOL EN EL MEDIO DE CULTIVO 70

5.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo..... 70

5.2. Análisis por HPLC de aminoácidos, aminas biógenas y del ión amonio 71

5.3. Análisis estadístico de los resultados 74

RESULTADOS Y DISCUSIÓN / RESULTS AND DISCUSSION

1. CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA Y CLONAL DE BACTERIAS ACÉTICAS DEL VINAGRE 75

1.1. Cultivo de las muestras de vinagres elaborados por el método sumergido 75

1.2. Observación de bacterias del vinagre al microscopio..... 76

1.3. Recuento de células por microscopía de fluorescencia 76

1.4. Validación método de microscopía de fluorescencia con bacterias lácticas y en condiciones enológicas 80

1.5. Identificación a nivel de especie de las bacterias acéticas aisladas 82

1.6. Identificación de bacterias acéticas a nivel clonal mediante ERIC-PCR..... 94

1.7. Plásmidos de *Ga. europaeus* 98

1.8. Identificación a nivel clonal de bacterias acéticas mediante análisis de restricción y PFGE 99

2. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LAS BACTERIAS PARA FORMAR BIOFILM..... 106

2.1. Optimización del método para la determinación de la capacidad formadora de biofilm de las bacterias lácticas 106

2.2. Análisis de la capacidad formadora de biofilm de bacterias lácticas 106

2.3. Visualización del biofilm al microscopio..... 110

2.4. Crecimiento de bacterias lácticas en presencia de etanol	113
2.5. Formación de biofilms de bacterias lácticas en presencia de etanol	118
3. PRODUCCIÓN DE NISINA EN CONDICIONES ENOLÓGICAS	127
3.1. Estudio de la producción de nisina por la cepa <i>L. lactis</i> LM29	127
3.2. Estudio del crecimiento y producción de nisina por <i>L. lactis</i> LM29 en MRS con etanol.....	130
3.3. Estudio del crecimiento y producción de nisina por <i>L. lactis</i> LM29 en MRS con mosto y etanol.....	133
3.4. Obtención de un extracto activo de nisina con características enológicas a partir de un cultivo de <i>L. lactis</i> LM29.....	135
3.5. Determinación de la actividad bacteriocina del extracto de nisina obtenido en condiciones enológicas frente a bacterias de origen enológico	136
4. EFECTO DE LA NISINA SOBRE BIOFILMS DE BACTERIAS ENOLÓGICAS	141
4.1. Efecto de la nisina sobre bacterias lácticas enológicas formadoras de biofilm.....	141
4.2. Efecto de la nisina en concentración subinhibitoria sobre la formación de biofilms de bacterias lácticas enológicas	142
4.3. Efecto de la nisina en concentración inhibitoria del crecimiento sobre la formación de biofilms de bacterias lácticas enológicas.....	148
4.4. Efecto de la nisina sobre la capacidad formadora de biofilm de bacterias acéticas	152
5. METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS DE <i>Lactococcus lactis</i> EN PRESENCIA DE ETANOL	155
5.1. Análisis de compuestos aminados mediante HPLC de fase reversa.....	155
5.2. Utilización de arginina por <i>L. lactis</i> en presencia de etanol en el medio de cultivo	158
5.3. Estudio de otros aminoácidos, amonio y aminos biógenas en el cultivo de <i>L. lactis</i> en presencia de etanol	162

CONCLUSIONES	175
---------------------------	------------

CONCLUSIONS	179
--------------------------	------------

BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY	181
--	------------

ANEXOS / ANNEXES	201
-------------------------------	------------

Article 1: Strain typing of acetic acid bacteria responsible for vinegar production by the submerged elaboration method. Rocío Fernández-Pérez, Carmen Torres, Susana Sanz, Fernanda Ruiz-Larrea. Food Microbiology (2010) 27: 973-978.

Article 2: Rapid molecular methods for enumeration and taxonomical identification of acetic acid bacteria responsible for submerged vinegar production. Rocío Fernández-Pérez, Carmen Torres, Susana Sanz, Fernanda Ruiz-Larrea. European Food Research and Technology (2010) 231: 813–819.

Article 3: Transcriptome analysis shows activation of the arginine deiminase pathway in *Lactococcus lactis* as a direct response to ethanol stress. Lorena Díez, Ana Solopova, Rocío Fernández-Pérez, Miriam González, Carmen Tenorio, Oscar P. Kuipers, Fernanda Ruiz-Larrea. Applied and Environmental Microbiology (submitted).

Abreviaturas / Abbreviations

ABC	Tipo de transportador dependiente del ATP (ATP Binding Cassette)
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADI	Arginina deiminasa
AFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism)
AGDI	Agmatina deiminasa
ANOVA	Análisis de la varianza
ATP	Adenosín trifosfato
BA	Bacterias Acéticas
BHI	Medio de cultivo Brain Heart Infusion
BL	Bacterias Lácticas
CDM	Chemical Defined Medium
CE	Carbamato de etilo
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CHEF	Clamped Homogeneous Electric Field
CK	Carbamato quinasa
cm	Centímetros
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
D.O.	Densidad óptica
D.O.Ca.	Denominación de Origen Calificada
Da	Dalton
DAD	Detector de fotodiodos (Diode Array Detector)
DEEMM	DiEtil Etoxi-Metilen-Malonato
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
Dha	Dehidroalanina
Dhb	Dehidroburitina
DNA	Ácido desoxirribonucleico (DeoxyriboNucleic Acid)
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato (deoxyNucleotide TriPhosphate)
EDTA	Ácido EtilenDiaminoTetraAcético

EFSA	European Food Safety Authority
EPS	Exopolisacáridos
ERIC	Secuencias intergénicas repetitivas de enterobacterias (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)
<i>et al.</i>	y colaboradores
EtOH	Etanol
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Hibridación in situ con fluorescencia (Fluorescent In Situ Hybridization)
FML	Fermentación Maloláctica
g	Gramos
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GY	Glucosa - extracto de levadura (Glucose Yeast-Extract)
h	Horas
hl	Hectolitro
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión (High Pressure Liquid Chromatography)
ITS	Región intergénica (Internal Transcribed Spacer)
Kb	Kilobases
kDa	kiloDalton
l	Litro
LPS	Lipopolisacáridos
mA	Miliamperios
MALDI-TOFF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization -Time-Of-Flight
Mb	Megabases
MBS	Metabisulfito potásico
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MRS	Medio de cultivo Man, Rogosa y Sharpe
MS	Espectrometría de masas
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido

ng	Nanogramo
NICE	NIsin-Controlled Expresión
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
°C	Grados centígrados
OTC	Ornitina carbamil-transferasa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PFGE	Electroforesis en campos pulsados (Pulsed Field Gel Electrophoresis)
PQQ	Pyrroloquinolina quinona
QPS	Qualified Presumption of Safety
RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (Random Amplification of Polymorphic DNA)
REP	Elementos Palindrómicos Extragénicos Repetitivos (Repetitive Extragenic Palindromic)
RFLP	Análisis polimórfico de fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
SDS	Dodecilsulfato sódico
SO ₂	Anhídrido sulfuroso
Tris	Tris(hidroximetilo)aminometano
TSA	Medio de cultivo Tryptic Soy Agar
TSAYE	Medio de cultivo Tryptic Soy Agar Yeast Extract
TTGE	Electroforesis en gel con gradiente de temperatura (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis)
U	Unidades
U.A.	Unidades Actividad
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means
V	Voltios
v/v	Relación volumen/volumen
VBNC	Viable pero no cultivable

W	Watios
w/v	Relación peso/volumen
x g	Número de veces la fuerza de la gravedad
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micra o micrómetro
µM	Micromolar

Abreviaturas taxonomía

<i>A. aceti</i>	<i>Acetobacter aceti</i>
<i>A. cerevisiae</i>	<i>Acetobacter cerevisiae</i>
<i>A. hansenii</i>	<i>Acetobacter hansenii</i>
<i>A. intermedius</i>	<i>Acetobacter intermedius</i>
<i>A. liquefaciens</i>	<i>Acetobacter liquefaciens</i>
<i>A. malorum</i>	<i>Acetobacter malorum</i>
<i>A. obodiens</i>	<i>Acetobacter obodiens</i>
<i>A. pasteurianus</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
<i>A. pomorum</i>	<i>Acetobacter pomorum</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>C. piscicola</i>	<i>Carnobacterium piscicola</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>G. oxydans</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>
<i>Ga. entanii</i>	<i>Gluconacetobacter entanii</i>
<i>Ga. europaeus</i>	<i>Gluconacetobacter europaeus</i>
<i>Ga. hansenii</i>	<i>Gluconacetobacter hansenii</i>
<i>Ga. intermedius</i>	<i>Gluconacetobacter intermedius</i>
<i>Ga. kakiaceti</i>	<i>Gluconacetobacter kakiaceti</i>
<i>Ga. liquefaciens</i>	<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>
<i>Ga. nataicola</i>	<i>Gluconacetobacter nataicola</i>

<i>Ga. oboediens</i>	<i>Gluconacetobacter obodiens</i>
<i>Ga. rhaeticus</i>	<i>Gluconacetobacter rhaeticus</i>
<i>Ga. saccharivorans</i>	<i>Gluconacetobacter saccharivorans</i>
<i>Ga. sucrofermentans</i>	<i>Gluconacetobacter sucrofermentans</i>
<i>Ga. swingsii</i>	<i>Gluconacetobacter swingsii</i>
<i>Ga. xylinus</i>	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>
<i>K. europaeus</i>	<i>Komagataeibacter europaeus</i>
<i>K. xylinus</i>	<i>Komagataeibacter xylinus</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>L. brevis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>L. buchneri</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>
<i>L. casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>L. fructivorans</i>	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
<i>L. hilgardii</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. mali</i>	<i>Lactobacillus mali</i>
<i>L. mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>L. sake</i>	<i>Lactobacillus sake</i>
<i>O. oeni</i>	<i>Oenococcus oeni</i>
<i>P. acidilactici</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>P. damnosus</i>	<i>Pediococcus damnosus</i>
<i>P. parvulus</i>	<i>Pediococcus parvulus</i>
<i>P. pentosaceus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. enteritidis</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

Lista de Tablas / List of Tables

Tabla I-1. Carácter fermentativo de las principales especies de BL aisladas en uvas, mosto y vino.

Tabla I-2. Clasificación de las bacteriocinas de clase I.

Tabla I-3. Géneros descritos en 2014 para la familia *Acetobacteraceae*.

Tabla I-4. Especies de los géneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* y *Komagataeibacter*.

Tabla I-5. Especies de BA descritas en vino y vinagre.

Tabla II-1. Composición del medio CDM utilizado en este estudio.

Tabla II-2. Cepas control de bacterias acéticas utilizadas en este estudio.

Tabla II-3. Bacterias utilizadas en el estudio de la capacidad formadora de biofilm.

Tabla II-4. Cepas de bacterias lácticas y acéticas utilizadas para el estudio de sensibilidad frente al extracto activo de nisina obtenido en este estudio.

Tabla II-5. Cepas utilizadas en el estudio metabólico de *L. lactis* MG1363.

Tabla II-6. Gradiente de los eluyentes para la determinación por HPLC de las aminoenonas derivadas de aminoácidos, amins biógenas e ión amonio.

Tabla III-1. Recuentos de células viables mediante el método de microscopía de fluorescencia, y velocidad de fermentación en los vinagres estudiados.

Tabla III-2. Nombre e identificación de especie de 90 aislados obtenidos de las muestras de vinagre estudiadas.

Tabla III-3. Identificación de especie por PCR ITS 16S-23S, secuenciación y comparación con datos de GenBank (Blast-N) de aislados de BA de los vinagres estudiados.

Tabla III-4. Patrones obtenidos por ERIC-PCR para 90 aislados de BA de vinagre.

Tabla III-5. Cepas identificadas por el método de ERIC-PCR en las 37 muestras de vinagre estudiadas.

Tabla III-6. Patrones obtenidos en el análisis de restricción con *SpeI* y PFGE de 77 aislados de BA del vinagre.

Tabla III-7. Cepas identificadas según el análisis de restricción con *SpeI* y PFGE en cada una de las 32 muestras de vinagre estudiadas.

Tabla III-8. Resultados de población de bacterias viables y actividad obtenidos durante la obtención del extracto activo en condiciones enológicas.

Tabla III-9. Composición del extracto activo obtenido con nisina.

Tabla III-10. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de MBS (metabisulfito), EtOH (etanol) y nisina de las BL formadoras de biofilm.

Tabla III-11. Valores de CMI del MBS (metabisulfito), el etanol y la nisina frente a las BA analizadas.

Tabla III-12. Análisis de la capacidad de formar biofilm de BA aisladas de vinagre mediante el test “ropy”.

Tabla III-13. Rectas de calibrado obtenidas para los aminoácidos y aminos biógenas analizados.

Tabla III-14. Concentraciones de aminoácidos en los sobrenadantes de los cultivos de la cepa MG1363 bajo las 4 condiciones estudiadas.

Tabla III-15. Concentraciones de aminoácidos en los sobrenadantes de los cultivos de la cepa MG Δ argR bajo las 4 condiciones estudiadas

Tabla III-16. Concentraciones de aminoácidos en los sobrenadantes de los cultivos de la cepa MG Δ ahrC bajo las 4 condiciones estudiadas.

Tabla III-17. Concentraciones de aminoácidos en los sobrenadantes de los cultivos de la cepa MG Δ argR Δ ahrC bajo las 4 condiciones estudiadas.

Tabla III-18. Resultados del análisis de aminos biógenas para la cepa wild type y sus tres mutantes con los 4 tratamientos ensayados.

Lista de Figuras / List of Figures

Figura I-1. Dinámica poblacional y de evolución de los microorganismos del vino: levaduras, bacterias lácticas y acéticas, presentes durante el proceso de vinificación y crianza.

Figura I-2. Fermentación maloláctica realizada por *O. oeni*.

Figura I-3. Formación de aminas biógenas (putrescina, histamina, tiramina y cadaverina) a partir de la descarboxilación de sus correspondientes aminoácidos.

Figura I-4. Equilibrios de disociación del ácido sulfuroso en medio acuoso.

Figura I-5. Oxidación del etanol en la cadena respiratoria de bacterias acéticas.

Figura I-6. Modelo de formación del biofilm y su ciclo de maduración.

Figura I-7. Estructura primaria de la nisina A.

Figura I-8. Representación del operón de genes para la síntesis de nisina (sistema NICE).

Figura I-9. Esquema del sistema NICE con sus componentes y su función.

Figura I-10. Mecanismo de acción de los lantibióticos de tipo A y B.

Figura I-11. Síntesis de arginina a partir de glutamato en *Lactococcus lactis*.

Figura I-12. Degradación de la arginina por la vía ADI en *Lactococcus lactis*.

Figura II-1. Estructura de las aminoenonas derivadas de aminoácidos.

Figura III-1. Bacilos cortos Gram negativos (BA) y levaduras observados en el vinagre tras tinción Gram.

Figura III-2. Bacilos cortos Gram negativos (BA) observados en el vinagre tras tinción Gram.

Figura III-3. Población de células viables y velocidades de fermentación de los vinagres estudiados.

Figura III-4. Fotografía de la imagen con fluorescencia de las células viables.

Figura III-5. Fotografía de la imagen con fluorescencia de las células no viables.

Figura III-6. Ajuste polinómico de segundo grado para la distribución de todos los puntos analizados en el análisis poblacional.

Figura III-7. Ajuste lineal para los análisis realizados con recuentos mayores o iguales a 1000 UFC/ml.

Figura III-8. Imágenes de microscopía de fluorescencia para las muestras de la cepa *L. mesenteroides* J32.

Figura III-9. Alineamiento de las secuencias de los aislados R1, R3, R48 y R55 con la cepa *Ga. europaeus* L18494 con número de acceso de secuencia [KC478464.1](#) en el GenBank.

Figura III-10. Alineamiento de las secuencias del aislado R36 con *Ga. xylinus* con número de acceso de secuencia [AB161453.1](#) en el GenBank.

Figura III-11. Alineamiento de las secuencias del aislado R90 con la cepa *A. pasteurianus* L15 con número de acceso de secuencia [AM049398.1](#) en el GenBank.

Figura III-12. Porcentaje de aparición de especies en los cuatro tipos de vinagre estudiados.

Figura III-13. Patrones de bandas obtenidos en el análisis por ERIC-PCR y dendrograma UPGMA generado para los 90 aislados de BA de vinagre.

Figura III-14. PFGE del DNA total de tres aislados *Ga. europaeus*.

Figura III-15. Patrones de bandas obtenidos mediante digestión con *SpeI* y PFGE de los DNAs bacterianos y dendrograma UPGMA para 77 aislados de BA obtenidos de vinagre.

Figura III-16. Cuantificación de biofilm de las cepas de la especie *Lactobacillus plantarum* estudiadas.

Figura III-17. Cuantificación de biofilm de las cepas de la especie *Leuconostoc mesenteroides* estudiadas.

Figura III-18. Cuantificación de biofilm de las cepas *Oenococcus oeni* estudiadas.

Figura III-19. Cuantificación de biofilm para el resto de especies de bacterias lácticas estudiadas.

Figura III-20. Fragmentos del biofilm de la cepa J32 teñidos con cristal violeta y visualizado en el microscopio.

Figura III-21. Fragmentos del biofilm de la cepa J32 teñidos con las sondas SYTO 9 y yoduro de propidio.

Figura III-22. Fragmentos del biofilm de la cepa J32 teñidos con las sondas SYTO 9, yoduro de propidio y con ambas sondas visualizadas a la vez mediante el uso de un filtro triple.

Figura III-23. Curvas de crecimiento de la cepa *L. mesenteroides* J32 en forma planctónica en el medio MRS con las concentraciones de etanol: 0, 2, 4, 8 y 12 % (v/v).

Figura III-24. Curvas de crecimiento de la cepa *L. mesenteroides* J57 en forma planctónica en el medio MRS con las concentraciones de etanol: 0, 2, 4, 8 y 12 % (v/v).

Figura III-25. Curvas de crecimiento de la cepa *L. plantarum* J39 en forma planctónica en el medio MRS con las concentraciones de etanol: 0, 2, 4, 8 y 12 % (v/v).

Figura III-26. Curvas de crecimiento de la cepa *O. oeni* IS151 en forma planctónica en el medio MRS con las concentraciones de etanol: 0, 2, 4, 8 y 12 % (v/v).

Figura III-27. A) Cuantificación del biofilm formado a las 48 h de incubación de la cepa *L. mesenteroides* J32 en BHI con 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 % etanol (v/v); B) Población de bacterias viables totales a las 48 h de incubación.

Figura III-28. A) Cuantificación del biofilm formado a las 48 h de incubación de la cepa *L. mesenteroides* J57 en BHI con 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12% etanol (v/v); B) Población de bacterias viables totales a las 48 h de incubación.

Figura III-29. A) Cuantificación del biofilm formado a las 48 h de incubación de la cepa *L. plantarum* J39 en BHI con 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 % etanol (v/v); B) Población de bacterias viables totales a las 48h de incubación.

Figura III-30. A) Cuantificación del biofilm formado a las 48 h de incubación de la cepa *O. oeni* IS151 en BHI con 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 % etanol (v/v); B) Población de bacterias viables totales a las 48 h de incubación.

Figura III-31. A) Cuantificación del biofilm de la cepa *L. mesenteroides* J32 después de 24h de incubación del biofilm inicial con etanol [adición BHI con 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 % etanol (v/v)]. B) Población total de células viables (UFC/ml) tras 24 h incubación.

Figura III-32. A) Cuantificación del biofilm de la cepa *L. mesenteroides* J57 después de 24 h de incubación del biofilm inicial con etanol [adición BHI con 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 % etanol (v/v)]. B) Población total de células viables (UFC/ml) tras 24 h de incubación.

Figura III-33. A) Cuantificación del biofilm de la cepa *L. plantarum* J39 después de 24 h de incubación del biofilm inicial con etanol [adición BHI con 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 % etanol (v/v)]. B) Población total de células viables (UFC/ml) tras 24 h de incubación.

Figura III-34. A) Cuantificación del biofilm de la cepa *O. oeni* IS151 después de 24 h de incubación del biofilm inicial con etanol [adición BHI con 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 % etanol (v/v)]. B) Población total de células viables (UFC/ml) tras 24 h de incubación.

Figura III-35. Curva de crecimiento de la cepa *L. lactis* LM29 en el medio MRS.

Figura III-36. Medidas de actividad bacteriocina de los extractos realizadas por las técnicas de difusión en agar y microtiter.

Figura III-37. Evolución de la población de bacterias viables y actividad bacteriocina determinada por microtiter durante la incubación durante 24 h de *L. lactis* LM29 en el medio MRS con 0, 20, 40, 60, 80 y 100 % (v/v) de mosto.

Figura III-38. Evolución de la población de bacterias y actividad bacteriocina medida por microtiter durante 24h de incubación de *L. lactis* LM29 en medio MRS con 0, 2, 6, 8, 10 y 12 % (v/v) de etanol.

Figura III-39. Evolución de la población de bacterias y actividad bacteriocina medida por microtiter durante 48 h de incubación de la cepa *L. lactis* LM29 en MRS con 0, 2, 4, 8 y 12 % (v/v) de etanol.

Figura III-40. Evolución de la población de bacterias y actividad bacteriocina medida por microtiter durante las 48 h de incubación de la cepa *L. lactis* LM29 en MRS, MRS + 60 % mosto, MRS + 60 % mosto + 8 % etanol y MRS + 60 % mosto + 12 % etanol.

Figura III-41. Foto donde se muestran los resultados obtenidos por la técnica de difusión en agar de la inhibición de la cepa C531 por el extracto.

Figura III-42. Se representa el número de cepas de *O. oeni* frente al factor de dilución máximo del extracto con el que se inhibe su crecimiento en el ensayo microtiter.

Figura III-43. Se representa el número de cepas de bacterias lácticas excepto *O. oeni* frente al factor de dilución máximo del extracto con el que se inhiben en el ensayo microtiter.

Figura III-44. Se representa el número de cepas de bacterias acéticas frente al factor de dilución máximo del extracto con el que se inhiben en el ensayo microtiter.

Figura III-45. A) Cuantificación del biofilm de la cepa *L. mesenteroides* J32 formado durante 48 h de incubación en el medio líquido BHI con etanol (0, 2, 4, 6 y 8 % (v/v)) y nisina (0 y 6 µg/ml). B) Población total de células viables (UFC/ml) en los medios con BHI con etanol (0, 2, 4, 6 y 8 %) y con 0 y 6 µg/ml de nisina.

Figura III-46. A) Cuantificación del biofilm de la cepa *L. mesenteroides* J57 formado durante 48 h de incubación en el medio líquido BHI con etanol (0, 2, 4, 6 y 8 % (v/v)) y nisina (0 y 6 µg/ml). B)

Población total de células viables (UFC/ml) en los medios con BHI con etanol (0, 2, 4, 6 y 8 %) y con 0 y 6 µg/ml de nisina.

Figura III-47. A) Cuantificación del biofilm de la cepa *L. plantarum* J39 formado durante 48 h de incubación en el medio líquido BHI con etanol (0, 2, 4, 6 y 8 % (v/v)) y nisina (0 y 6 µg/ml). B) Población total de células viables (UFC/ml) en los medios con BHI con etanol (0, 2, 4, 6 y 8 %) y con 0 y 6 µg/ml de nisina.

Figura III-48. A) Cuantificación del biofilm de la cepa *O. oeni* IS151 formado durante 48 h de incubación en el medio líquido BHI con etanol (0, 2, 4, 6 y 8 % (v/v)) y nisina (0 y 6 µg/ml). B) Población total de células viables (UFC/ml) en los medios con BHI con etanol (0, 2, 4, 6 y 8 %) y con 0 y 6 µg/ml de nisina.

Figura III-49. Cuantificación del biofilm de las cepas después de 24 h de incubación de un biofilm formado (durante 48h en BHI) con etanol y nisina (BHI con 0, 2, 4, 6 y 8 % etanol con 0 y 6 µg/ml de nisina) para las cepas A) *L. mesenteroides* J32; B) *L. mesenteroides* J57; C) *L. plantarum* J39 y D) *O. oeni* IS151.

Figura III-50. Biofilm formado durante 48 h en el medio BHI con 0, 2, 4, 6 y 8 % etanol en combinación con 0 y 200 µg/ml de nisina para las cepas: A) *L. mesenteroides* J32; B) *L. mesenteroides* J57 y C) *L. plantarum* J39.

Figura III-51. Biofilm formado a las 24 h de incubación en BHI con 0, 2, 4, 6 y 8 % etanol en combinación con 0 y 200 µg/ml de nisina. Medio añadido sobre un biofilm previamente formado durante 48h en BHI sin los antimicrobianos, de las cepas: A) *L. mesenteroides* J32; B) *L. mesenteroides* J57 y C) *L. plantarum* J39.

Figura III-52. Cromatograma de la muestra de la cepa MGΔ*ahrC* a t=0 con el tratamiento: Con Arg y 0% etanol.

Figura III-53. Concentración de arginina y ornitina en el medio de cultivo de la cepa MG1363 en la fase estacionaria de crecimiento para los cuatro tratamientos ensayados

Figura III-54. Concentración de arginina y ornitina en el medio de cultivo de la cepa MGΔ*argR* en la fase estacionaria de crecimiento para los cuatro tratamientos ensayados.

Figura III-55. Concentración de arginina y ornitina en el medio de cultivo de la cepa MGΔ*ahrC* en la fase estacionaria de crecimiento para los cuatro tratamientos ensayados.

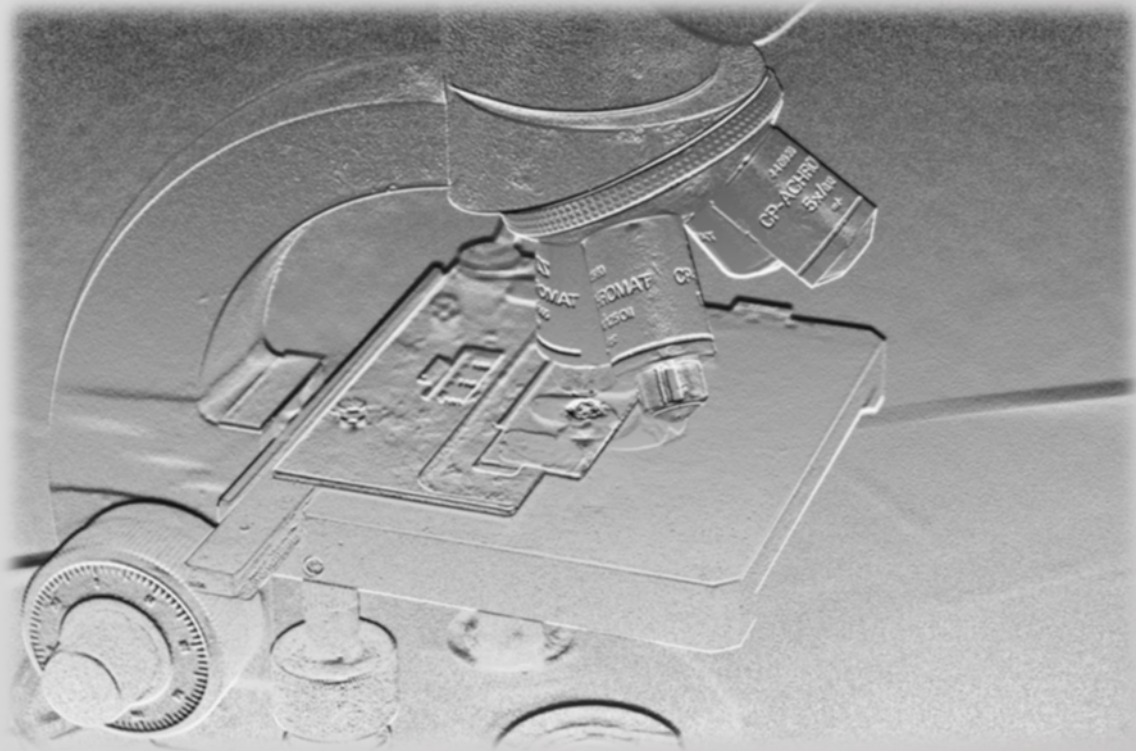
Figura III-56. Concentración de arginina y ornitina en el medio de cultivo de la cepa MGΔ*argR*Δ*ahrC* en la fase estacionaria de crecimiento para los cuatro tratamientos ensayados.

Figura III-57. Ruta ADI de degradación de la arginina.

Figura III-58. Relación entre la concentración de amonio en el sobrenadante del cultivo en la fase estacionaria y la concentración inicial para los 4 tratamientos utilizados y las 4 cepas ensayadas.

Figura III-59. Concentración de aminoácidos en los sobrenadantes de los cultivos de la cepa A) MG1363; B) MGΔ*argR*; C) MGΔ*ahrC*; D) MGΔ*argR*Δ*ahrC* bajo las 4 condiciones estudiadas.

Figura III-60. Rutas de generación de putrescina y espermidina por *L. lactis* MG1363 a partir del aminoácido arginina por dos vías (vía ADI y vía AgDI).



Resumen

Summary

RESUMEN

La comunidad de microorganismos implicados en los procesos de elaboración del vino y del vinagre es muy diversa, compleja y poco caracterizada, siendo precisamente esos microorganismos los responsables de las fermentaciones, es decir, de las transformaciones del zumo de uva en vino y de éste en vinagre. Durante estas fermentaciones, los microorganismos producen numerosos cambios en la composición, color y en los atributos organolépticos que finalmente marcarán la calidad del producto. Las bacterias lácticas (BL) y las bacterias acéticas (BA) son las dos familias bacterianas implicadas en estas transformaciones del contexto enológico. Los objetivos generales de esta tesis son: a) la caracterización a nivel taxonómico y clonal de BA responsables de la fermentación acética de distintos vinagres industriales elaborados por el método sumergido, y b) estudiar la posibilidad del empleo de la bacteriocina nisina en la elaboración y control microbiológico del vino y como agente contra la formación de biofilms bacterianos no deseados en el ámbito de la bodega.

En esta tesis se han desarrollado y puesto a punto metodologías basadas en el análisis del DNA para la identificación taxonómica y clonal de BA aisladas de muestras en plena fermentación acética de vinagres de vinos, sidras y alcohol etílico. Asimismo, se ha puesto a punto el método de microscopía de fluorescencia para la cuantificación de BA en muestras de vinagres y de BL en muestras de vinos, resultando ser un método rápido y eficaz. Respecto a la identificación clonal, los resultados obtenidos mostraron que el método de análisis de restricción del DNA genómico con la enzima *SpeI* y la electroforesis de campos pulsados es el método adecuado para estudiar cepas de BA, mientras que el método rápido ERIC-PCR es un método apropiado para el seguimiento de una cepa específica de BA previamente caracterizada y que se desee seguir su implantación en un proceso de acetificación. Se identificaron de las muestras de vinagres un total de 43 nuevos clones de BA que pasaron a formar parte de la colección de la Universidad de La Rioja de cepas bacterianas autóctonas responsables de fermentaciones, destacando dos clones *G.*

europaeus que podrían constituir excelentes candidatos para la selección de cultivos iniciadores para la elaboración de vinagre.

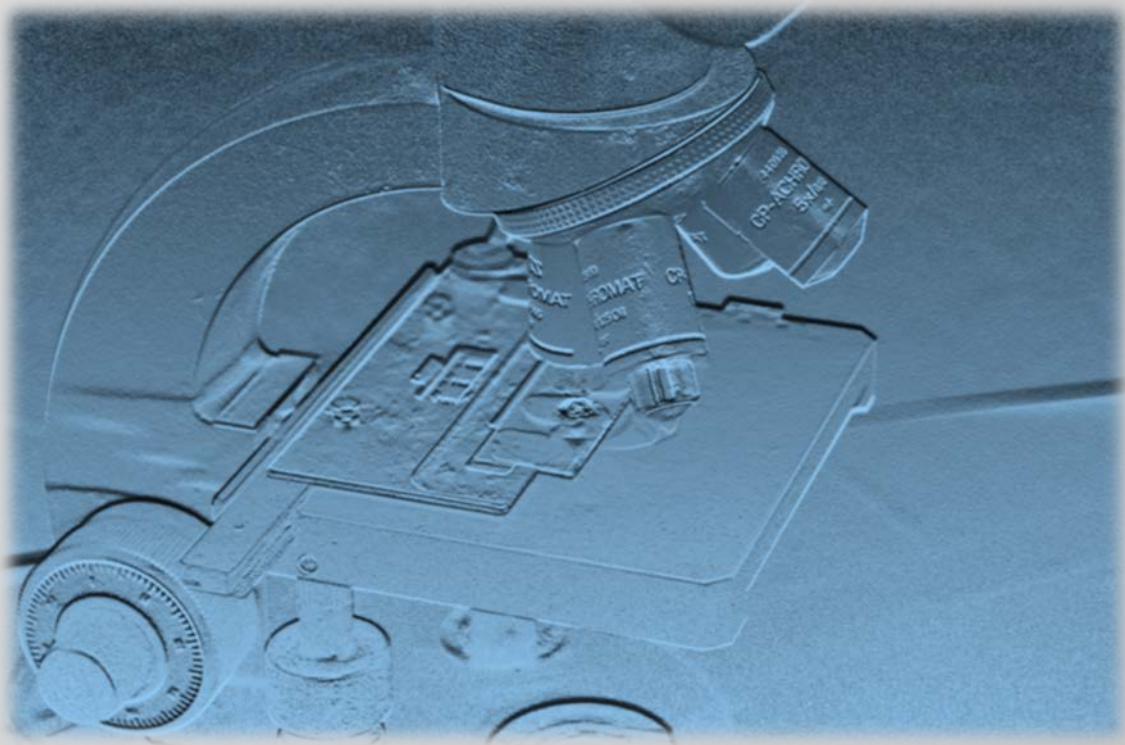
A partir de la BL con el estatus QPS (qualified presumption of safety) de la EFSA, *Lactococcus lactis* LM29, se consiguió un extracto que inhibía el crecimiento del 83,5 % de las BL enológicas y que contenía 60 % mosto de uva blanca y 200 µg/ml equivalentes de nisina. En esta concentración la nisina impidió la formación de biofilms de BL enológicas que presentaban esa capacidad alterante de los vinos y contaminante. Asimismo se estudió el metabolismo aminoacídico de *L. lactis* en presencia de etanol y se comprobó que esta BL utiliza la vía ADI (arginina deiminasa) de degradación de la arginina como mecanismo de respuesta a la presencia del etanol, generando ornitina y el ion amonio, si bien no generó en presencia ni en ausencia de etanol en el medio de cultivo ninguna de las aminas biógenas: agmatina, espermidina, feniletilamina, histamina, ni putrescina. Estos resultados indican que la nisina puede inhibir posibles BL contaminantes del vino y en las concentraciones adecuadas puede impedir la formación de biofilms indeseados, constituyendo por tanto una herramienta útil para el control microbiológico de los vinos y podría ayudar a la disminución de los niveles de sulfitos que actualmente se utilizan para la elaboración del vino.

SUMMARY

The community of microorganisms involved in wine and vinegar elaborations is very diverse, complex and scarcely characterized, and precisely microorganisms are responsible for the fermentations that take place, i.e. the transformations of grape juice into wine and wine into vinegar. During fermentations microorganisms produce numerous changes in the composition, colour, and organoleptic attributes of the fermented final product that will determine its quality. Lactic acid bacteria (LAB) and acetic acid bacteria (AAB) are the two bacterial families involved in these transformations within the oenological context. The overall objectives of this thesis are: a) to perform clonal and taxonomic characterization of AAB responsible for the acetic fermentation of a variety of industrial vinegars elaborated by the submerged method, and b) to study the possibility of using the bacteriocin nisin in winemaking to achieve wine microbiological control and against the formation of undesired bacterial biofilms.

In this thesis methodologies based on DNA analysis have been developed for clonal and taxonomic identification of AAB isolates from samples of wine- cider- and ethanol vinegars in full acetic fermentation. Moreover, the methodology of fluorescence microscopy has been developed for quantification of AAB in vinegar samples and LAB in wine samples. Regarding clonal identification, results showed as well that restriction analysis with *SpeI* of genomic DNA and pulsed field gel electrophoresis is an appropriate method for studying AAB strains, whereas the rapid method ERIC-PCR is appropriate for monitoring a previously characterized AAB strain and to determine its implantation in acetic fermentations. 43 new AAB clones from vinegar samples were identified, which became part of the bacteria collection of the University of La Rioja of indigenous strains responsible for fermentations. Two *G. europaeus* strains prevailed and could be excellent candidates for selection of starters for vinegar elaboration.

An active extract was obtained from the LAB strain with the QPS status (qualified presumption of safety) by the EFSA *Lactococcus lactis* LM29. The extract inhibited the growth of 83.5% of the oenological LAB collection and contained 60 % white grape must and 200 µg/ml of nisin equivalent. Nisin in this concentration prevented biofilm formation by LAB that presented this wine spoilage and microbial contamination feature. The amino acid metabolism of *L. lactis* in presence of ethanol was also studied and it was unveiled that this LAB utilizes the ADI (arginine deiminase) pathway of arginine degradation as mechanism of response to the presence of ethanol. It generated ornithine and ammonium, but it did not generate any biogenic amine (agmatine, spermidine, phenylethylamine, histamine, or putrescine) either in presence or in absence of ethanol in the culture broth. These results indicate that nisin preparations with the appropriate concentrations could inhibit undesired LAB and prevent biofilm formation, therefore they could constitute useful tools for the microbiological control of wines and could help to decrease the levels of sulphites that are currently used in winemaking.



Introducción

Introduction

1. BACTERIAS ENOLÓGICAS

1.1. La microbiota del vino

En enología las levaduras y las bacterias lácticas (BL) son los microorganismos responsables de los dos principales procesos que tienen lugar en transformación del mosto de uva en vino: la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica. En el vino las bacterias acéticas (BA) son microorganismos no deseados porque su crecimiento influye negativamente en la calidad del vino y son las responsables de la transformación del vino en vinagre. Diversos géneros y especies tanto de levaduras como de BL y BA están presentes y conviven variando su población durante el proceso de vinificación, el cual engloba todos los procesos y tratamientos empleados en la elaboración del vino: desde la uva, pasando por la entrada y procesamiento de ésta en bodega, las fermentaciones, los tratamientos de estabilización, embotellado, conservación y envejecimiento del vino. Estos microorganismos provienen de la uva, de los utensilios, tanques y materiales empleados en la bodega e incluso del aire de la bodega (Garijo *et al.*, 2008; Pérez-Martín *et al.*, 2014). Durante el proceso de vinificación también suele ser habitual añadir tanto levaduras como BL comerciales provenientes de cultivos seleccionados.

En primer lugar se lleva a cabo la fermentación alcohólica realizada por las levaduras, principalmente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, durante la cual se transforman los azúcares (glucosa y fructosa mayoritariamente) en etanol en presencia de oxígeno y generando además dióxido de carbono. A pesar de que inicialmente coexistan varias especies de levaduras en el mosto, al empezar la fermentación y comenzar a aumentar el nivel de etanol, la especie *S. cerevisiae* predomina y es la responsable de la fermentación.

Las BL llevan a cabo la fermentación maloláctica (FML), en la cual el ácido málico se transforma en ácido láctico y dióxido de carbono y suele realizarse después de la fermentación alcohólica. Son bacterias Gram-positivas, catalasa negativas, no esporuladas, con morfología dependiente del género (bacilos, cocos o coco-bacilos), agrupándose en parejas, cadenas o tétradas y son anaerobias aunque toleran el oxígeno. Presentan unos requerimientos nutricionales muy variados (aminoácidos, vitaminas, azúcares...). Producen ácido láctico a partir de la fermentación de la glucosa y otros azúcares como la xilosa, arabinosa o galactosa. Además de la morfología, la principal característica para su clasificación es su carácter fermentativo. Las BL homofermentativas sólo producen ácido láctico al fermentar la glucosa por la vía de la

glicolisis, sin embargo las heterofermentativas además del ácido láctico producen dióxido de carbono, etanol y ácido acético por la vía de las pentosas fosfato.

Los géneros de BL encontrados en el vino son: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Pediococcus* (Lonvaud-Funel 1999). El género *Pediococcus* es homofermentativo y *Leuconostoc* y *Oenococcus* son heterofermentativas. Los *Lactobacillus* aislados en el vino pueden ser heterofermentadores facultativos o estrictos. En la **Tabla I-1** se pueden ver las principales especies presentes en la uva, mosto y vino.

Tabla I-1. Carácter fermentativo de las principales especies de BL aisladas en uvas, mosto y vino (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Lactobacilos	Heterofermentativas facultativas	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
	Heterofermentativas estrictas	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i>
Cocos	Homofermentativas	<i>Pediococcus damnosus</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>
	Heterofermentativas	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>

En la uva se han identificado especies del género: *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. casei*, *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. plantarum*), *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*), *Pediococcus* (*P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*) y *Oenococcus oeni* (Lonvaud-Funel 1999). Las especies presentes en el mosto y los primeros días de fermentación alcohólica son: *L. casei*, *L. hilgardii*, *L. mali*, *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *P. damnosus* y en menor población *L. brevis* y *O. oeni* (Flanzy 2000). Durante la fermentación alcohólica está presente en mayor proporción *O. oeni*, aunque también *L. mesenteroides* y *L. plantarum* (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983). Al final de la fermentación alcohólica, donde el nivel de etanol es elevado, se reduce la viabilidad de la mayoría de las especies y casi únicamente *O. oeni* sobrevive, aunque también en algún caso *L. plantarum* y *L. hilgardii* resisten en estas condiciones. En raras ocasiones se aíslan especies como *L. brevis*, *L. mesenteroides* o *P. parvulus* (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1983). En la **Figura I-1** se puede observar la dinámica poblacional de BL durante las etapas de vinificación así como las de levaduras y BA (en naranja y verde respectivamente).

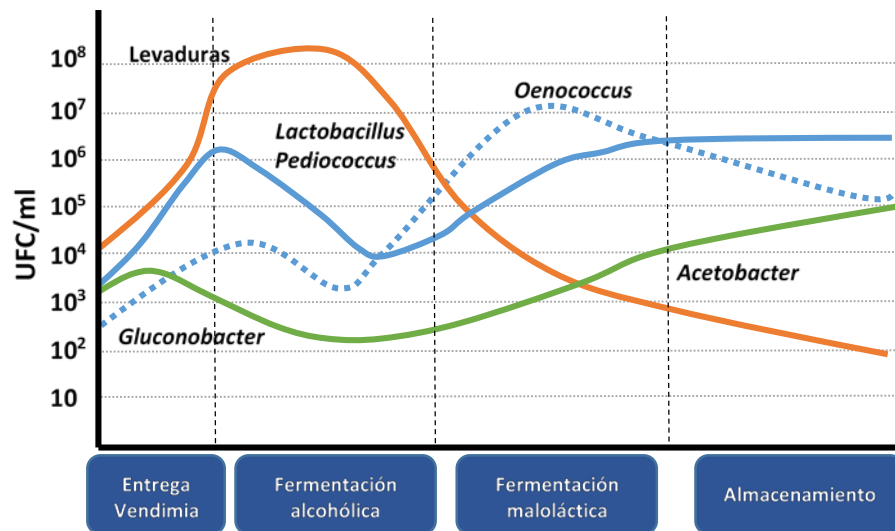


Figura I-1. Dinámica poblacional y de evolución de los microorganismos del vino: levaduras, bacterias lácticas y acéticas, presentes durante el proceso de vinificación y crianza (Lonvaud-Funel 2006).

La población de BL en las uvas es baja (10^2 - 10^4 UFC/ml) y dependen de las condiciones climáticas de la maduración así como del estado sanitario de las uvas. En el mosto y comienzo de fermentación alcohólica aumenta la población de algunas especies (10^4 - 10^6 UFC/ml) aunque depende del sulfitado del mosto (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Durante la fermentación alcohólica disminuye (10^2 - 10^3 UFC/ml) la población de BL y tiene lugar una selección a favor de las cepas más resistentes al alcohol y el pH. Cuando esta fermentación termina y las levaduras mueren, se liberan nutrientes al medio derivados de la autólisis de las levaduras, lo cual conlleva un incremento en la población de BL (hasta 10^7 UFC/ml) principalmente de la especie *O. oeni*, llevándose a cabo la FML. Cuando se ha degradado el ácido málico completamente, se considera finalizada la FML y se suelen sulfitar los vinos para evitar alteraciones posteriores.

Cuando la especie *O. oeni* alcanza poblaciones elevadas, comienza la FML. Normalmente la FML tiene lugar tras la fermentación alcohólica, y se dará más cercana o más lejana a ésta en el tiempo, dependiendo de que otras condiciones como la temperatura, pH, nivel de etanol, o concentración de nutrientes sean favorables para el crecimiento de *O. oeni* en el vino. La selección natural de *O. oeni* como prácticamente única superviviente durante la fermentación alcohólica y responsable de la FML es debido a su tolerancia al etanol (por encima del 10 % v/v) y a que puede crecer al pH del vino (entre 3 y 4). También se ha comprobado que la especie *L. plantarum* puede realizar la FML en vinos (Lonvaud-Funel 1999) aunque es menos común.

1.2. Las bacterias lácticas y la fermentación maloláctica del vino

La FML es la segunda transformación más importante en el vino, y consiste en la desacidificación biológica producida por la conversión del ácido L-málico (dicarboxílico) en ácido L-láctico (monocarboxílico) y dióxido de carbono (que aparece formando burbujas) debido a la acción de la enzima maloláctica de las BL (Lonvaud-Funel 1999) (Figura I-2). Este proceso conlleva la formación de otros productos secundarios que producen modificaciones en la composición y características organolépticas del vino.

La FML es una descarboxilación cuyo único beneficio para las BL parecería ser el aumento del pH externo. Sin embargo, la FML conlleva la pérdida de protones del citosol y CO_2 . A favor de gradiente los protones del exterior entran a través de la ATP sintasa, generando ATP. Por tanto *O. oeni* obtiene ATP en un medio como el vino donde apenas hay azúcares. La enzima maloláctica presenta un pH óptimo alrededor de 5,4 y requiere de cofactores (Mn^{++} y NAD^+) (Flanzy 2000).

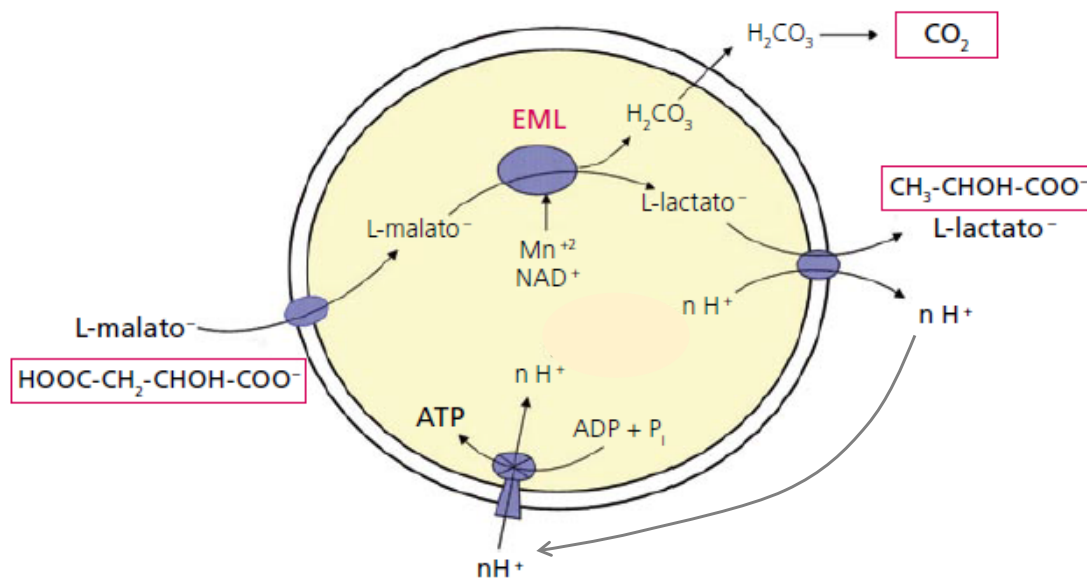


Figura I-2. Fermentación maloláctica realizada por *O. oeni*. EML: enzima maloláctica (Bordons & Reguant 2013).

La especie *O. oeni* es la que lidera esta FML, y como se ha señalado anteriormente, es seleccionada de forma natural como prácticamente única superviviente al finalizar la fermentación alcohólica, debido principalmente a su alta tolerancia al pH ácido del vino y al etanol; de hecho *O. oeni* ve estimulado su crecimiento por concentraciones de etanol de hasta 7 % v/v (G.-Alegría *et al.*, 2004). Esta especie presenta también la característica única de que en todos los genomas estudiados se encuentran varios genes dedicados al metabolismo de exopolisacáridos (EPS) (Dimipoulou *et al.*, 2014) y se ha descrito la producción de homo y

heteropolisacáridos por diferentes vías metabólicas (Dimopoulou *et al.*, 2012). Estos EPS pueden ser tanto capsulares (efecto protector frente a estrés ácido, osmótico, del etanol o del sulfito) como EPS liberados y solubles en el medio (Dols-Lafargue *et al.*, 2007), aunque estos últimos los produce en menor proporción. A pesar de que el genoma de *O. oeni* es de pequeño tamaño (1,8 Mb), dedica parte de sus genes al metabolismo de EPS, lo cual sugiere que esta característica es importante para que *O. oeni* pueda adaptarse al medio alcohólico.

La FML conlleva una serie de cambios esenciales y beneficiosos para los vinos tintos de calidad destinados a la crianza, donde es importante obtener estabilidad biológica en el tiempo y la complejidad aromática que proporciona la FML (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000; Hidalgo 2003). En otros casos puede ser no deseada, como en el caso de los vinos donde interesa la acidez y el frescor aportado por el ácido málico, o en vinos de consumo rápido. Para los vinos blancos se busca el carácter afrutado, fresco y joven y por tanto esta FML es innecesaria o incluso perjudicial, pero si se busca envejecer un vino blanco, puede ser aconsejable.

Los principales efectos beneficiosos que produce la FML es que suaviza el vino al reducir la acidez, reduce los aromas herbáceos y genera aromas más complejos, disminuye la astringencia al desaparecer el ácido málico, mejora la estabilidad del color y también lo estabiliza desde el punto de vista microbiológico. Sin embargo también presenta efectos perjudiciales como aumento del pH, aumento de la acidez volátil, desaparición de aromas afrutados y varietales, y pudiendo generar diacetilo en exceso en algunos casos. Los vinos tintos que han realizado la FML son mejor valorados en la cata, y especialmente si la han realizado en barrica lo cual añade caracteres tostados o de vainilla cedidos por la madera.

Una consecuencia negativa del crecimiento de ciertas BL en el vino y que el enólogo debe evitar es la generación de aminas biógenas tales como la histamina, la tiramina, la putrescina o la cadaverina (**Figura I-3**), las cuales se forman por descarboxilación de los aminoácidos precursores de estas aminas (Lonvaud-Funel 2001) por acción de las BL. Pueden llegar a encontrarse en el vino a más de 10 mg/l y pueden provocar en consumidores sensibles patologías que van desde migrañas a trastornos cardíacos. Especies de BL posibles formadoras de aminas biógenas, y por tanto consideradas indeseables en la vinificación son: *L. hilgardii*, *L. brevis*, *L. buchneri* y *P. parvulus* (Landete *et al.*, 2005, 2007). Algunas cepas de *O. oeni* pueden producir ciertas cantidades de histamina o en menor grado putrescina, por lo tanto, la no producción de aminas biógenas será un aspecto a tener muy en cuenta en la selección de cepas de *O. oeni* para ser cultivos iniciadores de la FML. Asimismo, la producción excesiva de EPS, como puede suceder por el crecimiento ocasional de algunas BL como *L. brevis*, *L. mesenteroides* o *P. damnosus*, confiere al vino un aspecto denso y viscoso y se produce la denominada

alteración de "la grasa" del vino, con la consecuente total pérdida de su calidad (Hidalgo 2003, Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

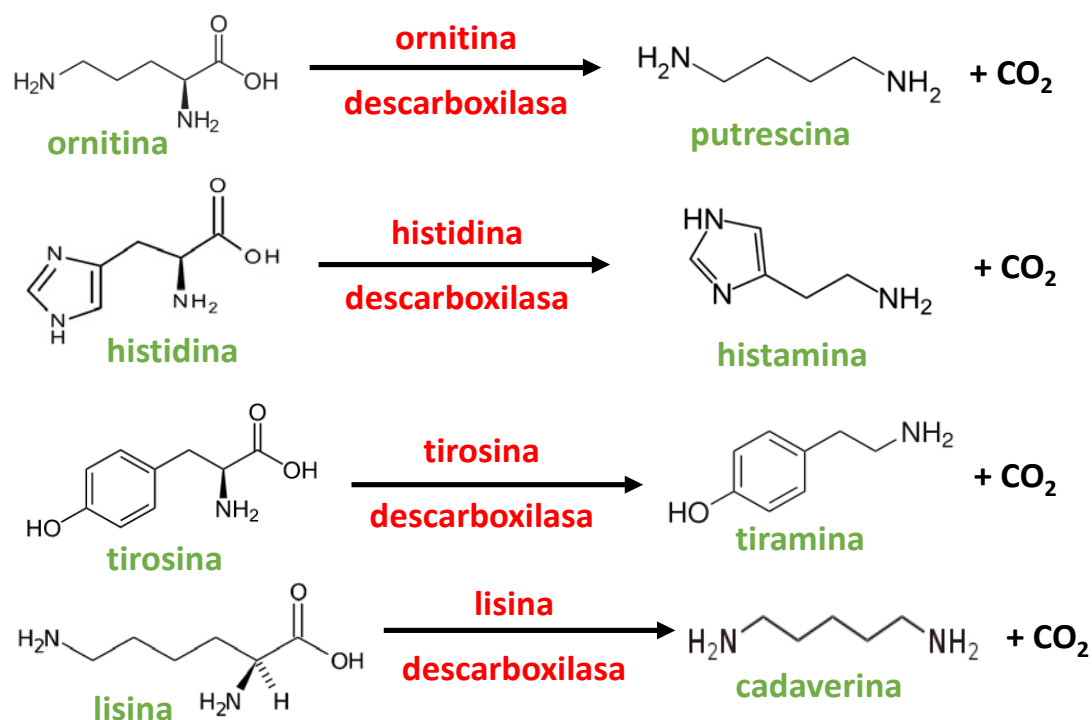


Figura I-3. Formación de aminas biógenas (putrescina, histamina, tiramina y cadaverina) a partir de la descarboxilación de sus correspondientes aminoácidos.

El carbamato de etilo es un compuesto potencialmente cancerígeno y tóxico, y se ha detectado ocasionalmente en algunos vinos en concentraciones muy bajas (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Este compuesto se genera por reacción con el etanol del vino a pH ácido de los diversos compuestos con grupo carbamílico que pueden ser generados por el crecimiento de las BL y también de las levaduras: la urea producida por las levaduras, o la citrulina generada por BL por la vía de la arginina deiminasa (vía ADI) de degradación de la arginina (Terrade & Mira de Orduña 2006). La especie *O. oeni* presenta una capacidad variable para degradar la arginina ya que posee los genes de la ruta ADI. Otras especies consideradas contaminantes como *L. brevis* o *L. buchneri* acumulan mayores cantidades de citrulina que *O. oeni* (Araque *et al.*, 2009). Cuando el ácido L-málico está presente se inhibe el consumo de arginina (Araque *et al.*, 2011), por tanto al finalizar la FML es importante sulfitar el vino para evitar el consumo de arginina y por tanto la posible acumulación de precursores del carbamato de etilo.

1.3. Las bacterias acéticas

Las BA son bacterias aerobias estrictas, Gram negativas, no esporuladas, de forma elipsoidal o redondeada y pueden aparecer solas, en parejas o en cadenas. El tamaño varía entre 0.4-1 µm de ancho y 0.8-4.5 µm de largo, siendo las BA catalasa positivas y oxidasa negativas. Son bacterias acidogénicas, el pH para su crecimiento óptimo es 5-6,5 y pueden crecer a pH menores entre 3 y 4 (Holt *et al.*, 1994). Pueden presentar flagelos peritricos o polares (González *et al.*, 2005). Las BA pertenecen a la familia denominada *Acetobacteraceae*, son ubiquotas en la naturaleza y obtienen energía de la reacción de oxidación del etanol a ácido acético. Esta transformación se denomina acetificación o fermentación acética y es el fundamento de la fabricación del vinagre.

Las BA no son deseadas en el vino precisamente por esa transformación del etanol en ácido acético que llevan a cabo, incrementando con ello la acidez volátil del vino. Un vino con más de 0,9 g/l de ácido acético se considera alterado, clasificándose como defectuoso organolépticamente. Sin embargo, es inevitable que se produzca un ligero aumento de la acidez volátil del vino durante el proceso de su elaboración puesto que el crecimiento de cualquiera de los microorganismos del vino (levaduras, BL o BA) genera una cierta cantidad de este ácido volátil. Por esta razón el enólogo impide el crecimiento innecesario e incontrolado de los microorganismos empleando para ello el anhídrido sulfuroso (**Figura I-4**), el agente antimicrobiano y antioxidante por excelencia en el campo de la enología.

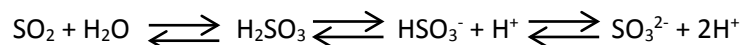


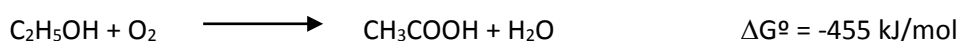
Figura I-4. Equilibrios de disociación del ácido sulfuroso en medio acuoso. (SO₂: anhídrido sulfuroso; H₂SO₃: ácido sulfuroso; HSO₃⁻: ión bisulfito; SO₃²⁻: ión sulfito)

Además el enólogo toma diferentes medidas para evitar el crecimiento de las bacterias aerobias, actuaciones tales como el relleno de depósitos y barricas, o el almacenamiento de las botellas tumbadas para evitar la entrada de oxígeno (Bartowsky & Henschke 2008). A pesar de que son aerobias estrictas, en el vino las BA sobreviven en ambientes anaerobios o semi-anaerobios (Drysdale & Fleet 1989), de modo que es casi imposible eliminar las BA del vino, y una vez generado el ácido acético no puede corregirse. Otras medidas para impedir el crecimiento de las BA son: obtener y utilizar uva sana, una buena limpieza y desinfección en la bodega, mantener los niveles de sulfuroso adecuados (25-30 mg/l), con especial cuidado si el vino contiene azúcares residuales, evitar el contacto con el oxígeno en el embotellado y en el

almacenamiento de las botellas, y mantener durante la crianza y conservación del vino la temperatura alrededor 10°C, temperatura a la cual las BA son menos activas.

Respecto a la ecología de las BA durante el proceso de vinificación, se muestra en la **Figura I-1** las diferentes poblaciones de BA encontradas en diferentes puntos de la elaboración de vino (Lonvaud-Funel 2006). Se han descrito niveles de 3×10^3 UFC/ml en uvas sanas y de hasta 5×10^6 UFC/ml en uvas atacadas por *Botrytis cinerea* (González *et al.*, 2004; Joyeux *et al.*, 1984). La población de BA descendería drásticamente durante la fermentación alcohólica, y se mantendría latente ($< 10^3$ UFC/ml) a lo largo de la FML y crianza en barrica. Una cantidad de 30 mg/l de oxígeno al año atraviesa la madera de las barricas y es suficiente para permitir la supervivencia de estas BA (Joyeux *et al.*, 1984), y las operaciones de bombeo o trasiego si no se realizan con mesura pueden llegar a proporcionar aireación suficiente como para promover su crecimiento y causar la alteración del vino.

La fermentación del etanol a ácido acético es un proceso que se realiza en dos pasos enzimáticos catalizados por dos enzimas intrínsecas de la membrana citoplasmática de las BA: la alcohol deshidrogenasa dependiente de quinona (PQQ-ADH: pyrroloquinoline quinone-dependent alcohol dehydrogenase EC 1.1.5.5) (Yakushi & Matsushita 2010) y la aldehído deshidrogenasa (ALDH: aldehyde dehydrogenase EC 1.2.1.5) (Gómez-Manzo *et al.*, 2010). Estas enzimas transfieren los electrones procedentes de la oxidación del alcohol a la ubiquinona de la membrana citoplasmática. Las BA poseen sus propias cadenas respiratorias que transfieren los electrones secuencialmente hasta el oxígeno del aire, último receptor de los electrones, el cual se reduce a agua (Yakushi & Matsushita 2010) (ver **Figura I-5**). Podríamos considerar a las BA como el paradigma de microorganismos adaptados al medio alcohólico, capaces de utilizar el etanol y obtener energía a partir de este "biocombustible" para su metabolismo, y la ecuación estequiométrica que rige esta fermentación (Gullo *et al.*, 2014) es:



Tal es su adaptación, que la mayoría de las cepas de BA pueden crecer en presencia de concentraciones de etanol entre el 6-10 % (v/v); se han aislado BA de vinos alterados que contenían hasta casi 15 % (v/v) de etanol (Flanzy 2000) y de bebidas fermentadas de alta graduación como el tequila o el sake (Raspor & Goranovic 2008). Es importante señalar que el efecto antimicrobiano del etanol se potencia con el pH ácido y que BA de la especie *Acetobacter pastorianus* son capaces de tolerar 12,5 % (v/v) etanol a pH 3,4, pero solamente resisten 8 % etanol cuando se encuentran en un medio a pH 3 (Flanzy 2000). En el caso de vinagres, las condiciones para iniciar el proceso industrial de acetificación son: 30°C, aireación intensa y un

medio líquido alcoholizado con un pH alrededor de 3,5, con un alto contenido en nutrientes y una concentración del 10 % al 18 % (v/v) de etanol (Raspor & Goranovic 2008).

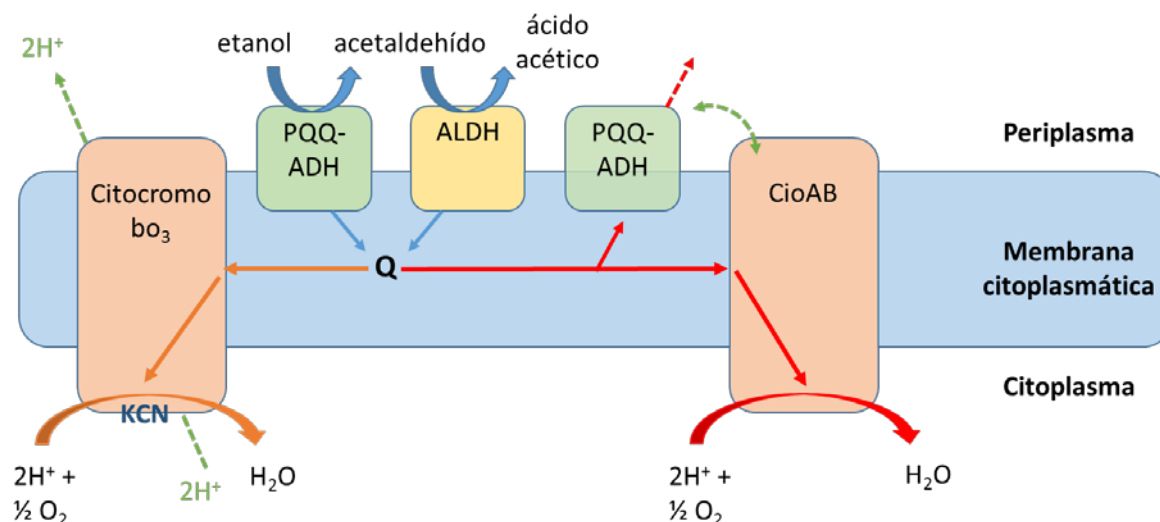


Figura I-5. Oxidación del etanol en la cadena respiratoria de bacterias acéticas (modificado de Yakushi & Matsushita 2010).

El oxígeno es un factor limitante para obtener la energía metabólica, y consecuentemente para el crecimiento de las BA; por esta razón el aporte de oxígeno se utiliza como una de las principales herramientas para evitar su crecimiento en el vino y para el manejo industrial de las BA, de forma que el sistema de difusión o generación de oxígeno permite alcanzar el funcionamiento apropiado de los fermentadores que son utilizados para la producción industrial del vinagre.

1.4. Formación de biofilms bacterianos

Se puede definir de manera general un biofilm como una comunidad de microorganismos que se encuentran unidos a una superficie (O'Toole *et al.*, 2000). Los microorganismos que forman el biofilm suelen estar embebidos en una matriz polimérica extracelular, compuesta por exopolisacáridos, proteínas y otras macromoléculas, así como diversos productos procedentes de la lisis de las bacterias (Branda *et al.*, 2005; Ramirez-Mata *et al.*, 2014). Existen muchos tipos de biofilms: biofilms formados sobre una superficie sólida, como puede ser la superficie de agar de una placa de cultivo, biofilms adheridos a una superficie sólida en la interfase de contacto con un líquido, como sucede cuando se produce una contaminación en mangueras y en depósitos de vinos que no han sido bien higienizados, biofilms que flotan sobre una superficie líquida en la interfase con el aire (el también denominado "velo", "manto", o "madre" en el caso del vinagre), y biofilms sumergidos en un líquido donde crecen las bacterias

(Vlamakis *et al.*, 2013). En el caso del vino, salvo en los vinos de crianza biológica, la formación de biofilms no es deseada e indica contaminación o crecimiento incontrolado de microorganismos. Todo lo contrario ocurre en el proceso de elaboración de vinagres: la formación del "velo" de BA o "madre" del vinagre es el requisito indispensable para la elaboración de los vinagres por el método tradicional o método de fermentación acética en superficie.

La formación del biofilm sigue varias etapas (O'Toole *et al.*, 2000; Nazar 2007): 1) acondicionamiento de la superficie; 2) unión inicial de las células a la superficie con una adhesión reversible; 3) adhesión irreversible; 4) maduración del biofilm y 5) desprendimiento de bacterias, incluso hasta la dispersión del biofilm, para la formación de nuevos biofilms. En la **Figura I-6** se representa este ciclo de formación del biofilm, comenzando con las células individuales suspendidas en el fluido flotando libremente, en su denominado estado planctónico. El contacto inicial célula-superficie normalmente es reversible, pero si los factores ambientales y la transmisión de las señales moleculares son favorables las células se unen de forma irreversible y comienzan a secretar EPS. La división celular y el crecimiento de la población, manteniendo la comunicación célula-célula, deriva en la formación de las microcolonias. El biofilm maduro posee una arquitectura compleja con microcolonias rodeadas de canales de agua que permiten el flujo de nutrientes en el interior del biofilm. La hidrodinámica y la comunicación célula-célula regulan el desarrollo de la arquitectura del biofilm (Stoodley *et al.*, 2002a). Algunas células pueden volver al modo planctónico asegurando la colonización de nuevos nichos. Este desprendimiento de las células continúa y ocurre por factores físicos o por una sucesión programada de etapas mediante moléculas señalizadoras que permiten una hidrólisis local de la matriz de EPS.

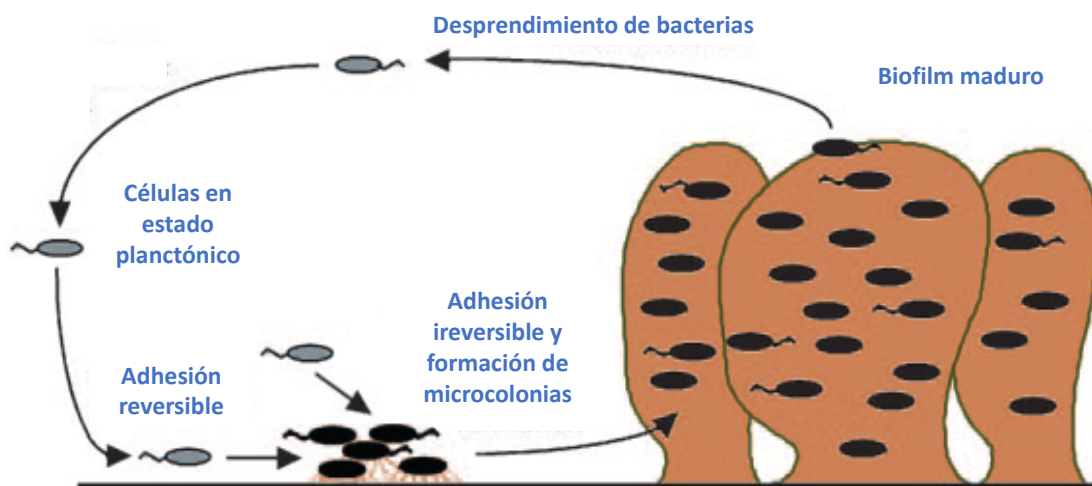


Figura I-6. Modelo de formación del biofilm y su ciclo de maduración (modificado de O'Toole *et al.*, 2000).

1) **Acondicionamiento de la superficie:** Las propiedades de la superficie juegan un papel fundamental en la adhesión bacteriana. De forma general, cualquier superficie es vulnerable para el desarrollo del biofilm, incluyendo plástico, cristal, metal, madera y productos alimentarios. La adhesión a la superficie depende de sus propiedades físico-químicas como la textura (Donlan 2002), la carga de la superficie (Abdallah *et al.*, 2009), hidrofobicidad (Donlan 2002), pH, temperatura (Nilsson 2011), y los nutrientes (Donlan 2002). Si la materia orgánica presente en el líquido se adsorbe sobre las superficies y forma lo que se denomina “*conditioning film*”, cambia las propiedades químicas y físicas de la interfase con el líquido, volviéndose más favorable para la adhesión bacteriana (Tang *et al.*, 2009).

2) **Adhesión reversible:** La unión inicial de la bacteria puede ser activa o pasiva dependiendo de la movilidad o del transporte de las células planctónicas y de la difusión o movimiento del fluido (precipitación de partículas, dinámica de fluidos) (Kumar & Anand 1998) pero depende principalmente de las propiedades físico-químicas de la superficie celular. Al principio las células que se adhieren sólo poseen una pequeña cantidad de EPS y pueden moverse de forma independiente (O’Toole & Kolter 1998b) gracias a los flagelos que facilitan su movilidad, o por deslizamiento por movimientos del fluido. La adhesión es reversible ya que los microorganismos todavía no han llevado a cabo el proceso de diferenciación, que conlleva cambios morfológicos, los cuales permiten la formación del biofilm. La adhesión inicial entre las bacterias y la superficie inerte se produce por interacciones no específicas (como podrían ser las hidrofóbicas), mientras que la adhesión a superficies vivas se realiza mediante mecanismos específicos de acoplamiento molecular (Dunne 2002).

3) **Adhesión irreversible:** El cambio de adhesión reversible a irreversible se produce por un cambio de la interacción débil de la bacteria con la superficie a un enlace permanente con la presencia de EPS. La transición hasta la adhesión permanente viene acompañada de cambios fisiológicos profundos (Stoodley *et al.*, 2002a). Después de que se ha producido la unión irreversible, se necesitan importantes fuerzas para romper los enlaces formados, por ejemplo por reacción con compuestos químicos, por enzimas, detergentes, desinfectantes y/o calor para poder eliminar el biofilm (Sinde & Carballo 2000). En esta fase predominan las reacciones moleculares entre las paredes bacterianas y la superficie. Estas reacciones implican una adhesión firme mediada por estructuras poliméricas superficiales como: cápsulas, fimbrias, pilis y EPS. La formación de microcolonias resulta de la acumulación y crecimiento de los microorganismos asociado con la producción de EPS, que ayuda a la unión con la superficie y estabiliza la colonia frente a estreses medioambientales (Donlan 2002).

La característica principal que diferencia a los biofilms de simplemente bacterias adheridas a una superficie es que en los biofilms aparecen EPS que rodean a las bacterias. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria, puede ser alginato (*Pseudomonas aeruginosa*), celulosa (*Salmonella typhimurium*), poli-N-acetilglucosamina (*Staphylococcus aureus*) y también pueden ser de diferente composición dependiendo de las condiciones ambientales. La producción de EPS es importante para la protección contra factores externos negativos para el crecimiento bacteriano.

4) **Maduración del biofilm:** En la maduración el biofilm se desarrolla según una estructura organizada que puede ser plana o en forma de “hongo” (Figura I-6). Las bacterias forman complejas microcolonias con canales de agua (Davey & O’Toole 2000), y muchas células alteran sus procesos fisiológicos (por ejemplo, crecen anaeróbicamente en las zonas profundas del biofilm) en respuesta a las condiciones dentro del biofilm. La densidad y complejidad del biofilm aumenta a medida que los organismos adheridos se replican, mueren y los componentes extracelulares de las bacterias interactúan con las moléculas orgánicas e inorgánicas del medio. El crecimiento del biofilm está limitado por la disponibilidad de nutrientes, la penetración de estos nutrientes dentro del biofilm y la eliminación de residuos. Otros factores que controlan la maduración del biofilm son: pH interno, penetración de oxígeno, fuentes de carbono y osmolaridad.

5) **Desprendimiento de bacterias:** La etapa de desprendimiento es la última en el ciclo de formación del biofilm, y permite a las células volver al estado planctónico (Sauer et al., 2002). A veces se produce el desprendimiento en una zona del biofilm solamente y quedan espacios que actúan de canales dentro del biofilm. Las microcolonias en división continua en el biofilm liberan residuos y nutrientes que pueden servir para acondicionar superficies desnudas y para alimentar otras células. Si las condiciones de flujo lo permiten, se establece un equilibrio entre el crecimiento de la colonia y el flujo del fluido que favorece la liberación de pocas células, pero con un flujo intenso se pueden desprender más células.

Las razones del desprendimiento pueden ser: a una perturbación externa como aumento en la fricción con el fluido (Stoodley et al., 2002b), procesos internos del biofilm como una degradación de EPS por enzimas endógenas, o la liberación de los EPS o de proteínas de unión a la superficie (Kaplan et al., 2003; 2004). Este desprendimiento hace posible la colonización de nuevos nichos (Sauer et al., 2002). La falta de nutrientes es una razón por la cual se desencadena el desprendimiento de las células para permitir la búsqueda de nutrientes en otras zonas (O’Toole & Kaplan 2000) y puede implicar el establecimiento de un nuevo biofilm en otra zona.

1.5. Resistencia del biofilm

Las bacterias que crecen formando un biofilm sobre una superficie son generalmente más resistentes a agentes antimicrobianos (biocidas y antibióticos) que aquellas bacterias que crecen en el estado libre o planctónico (Costerton *et al.*, 1999; Dunne 2002) ya que, entre otros factores, la elevada concentración de EPS que protegen el biofilm les permite presentar resistencia a los biocidas (O'Toole *et al.*, 2000). Así se ha demostrado que las células del biofilm pueden ser entre 10 y 1000 veces más resistentes que las células planctónicas a un gran número de antibióticos de amplio espectro (ampicilina, estreptomicina, tetraciclinas, gentamicina, etc.) y de biocidas oxidantes del tipo del cloro, el yodo o el ozono (Stewart & Costerton 2001; Brown *et al.*, 1995; Muller *et al.*, 2007). Los mecanismos de resistencia de los biofilms son los siguientes:

- a) Penetración restringida del antimicrobiano: debido a los EPS de la matriz que limitan la difusión del antimicrobiano por la unión de éste a las bacterias externas y así confiere resistencia a las células del interior del biofilm.
- b) Baja tasa de crecimiento: la disminución de la tasa de crecimiento en ciertos sectores del biofilm es una estrategia efectiva para la supervivencia de dichas células, ya que los antibióticos son más efectivos en el ataque rápido de las células en crecimiento.
- c) Cambios fenotípicos: las bacterias expresan genes en respuesta a cambios ambientales de temperatura, oxidación, baja disponibilidad de oxígeno, daños del DNA, que se transfieren y logran un mecanismo de supervivencia específico y la resistencia a numerosos agentes.

Estos factores solos o en combinación explican la supervivencia de las bacterias dentro de estas comunidades en el biofilm.

2. LA BACTERIOCINA NISINA

2.1. Definición y clasificación de las bacteriocinas de bacterias lácticas

Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica, sintetizadas por las bacterias a nivel ribosómico y que posteriormente pueden sufrir modificaciones post-traduccionales. Las bacteriocinas son activas generalmente frente a microorganismos relacionados taxonómicamente con la especie productora (Tagg *et al.*, 1976), pero también se ha podido comprobar la acción bacteriocina frente a microorganismos taxonómicamente muy distantes (Rojo-Bezares *et al.*, 2007).

Las bacteriocinas se describieron por primera vez en *E. coli* (Gratia 1925) y se denominaron colicinas. El descubrimiento de la nisina en 1928 (Rogers & Whittier 1928) se produjo al observar cómo algunas cepas de *Lactococcus lactis* inhibían el crecimiento de otras BL. En la industria quesera se detectó la producción de bacteriocinas por BL responsables del proceso de elaboración, y estas bacteriocinas inhibían el crecimiento de bacterias patógenas y nocivas para la conservación del queso (Cotter *et al.*, 2005). La nisina es de gran interés en la industria alimentaria ya que se usa como conservante antibacteriano (Delves-Broughton *et al.*, 1996). La nisina producida por *L. lactis* está reconocida por la FDA (Food and Drug Administration) para ser utilizada comercialmente, y está legalizada como conservante (E-234) en la Unión Europea y EEUU. Por lo tanto resulta de gran interés su utilización como bioconservante en la industria alimentaria ya que evita las alteraciones ocasionadas por bacterias Gram-positivas tales como *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria* (Cotter *et al.*, 2005). Desde el descubrimiento de la nisina hasta la actualidad se ha descrito la producción de bacteriocinas todos los géneros de BL, y hasta el día de hoy se están encontrando nuevas bacteriocinas (Zendo 2013; Pérez *et al.*, 2014).

Las bacteriocinas producidas por BL constituyen un grupo estructural y funcionalmente muy amplio y heterogéneo. Presentan en general un rango de inhibición amplio, no siempre requieren de receptores específicos para su acción bacteriocina, y sus determinantes genéticos pueden localizarse tanto en el cromosoma como en plásmidos (Tagg *et al.*, 1976). Son péptidos de bajo peso molecular, de naturaleza catiónica e hidrofóbicos, que forman poros en la membrana plasmática de las células sensibles, siendo por tanto bactericidas (Moll *et al.*, 1999). Aunque la mayoría de ellas están constituidas por los aminoácidos naturales de las proteínas, es de destacar la presencia de aminoácidos modificados (lantionina y β -metil-lantionina y sus

precursores dehidroalanina y dehidrobutirina) en la forma activa de aquellas que reciben el nombre genérico de lantibióticos.

Las bacteriocinas de BL se han clasificado en base a su secuencia de aminoácidos, la estabilidad al calor, el tamaño, el modo de acción, actividad biológica, mecanismos de secreción y la presencia de aminoácidos modificados. Las bacteriocinas de las BL se han clasificado en 4 grandes clases (Diep & Nes 2002; Cotter *et al.*, 2005; Klaenhammer 1993):

- **Clase I (Lantibióticos):** se denominan lantibióticos y son péptidos pequeños (<5 kDa y 19-38 aminoácidos de longitud), termoestables, y que se caracterizan por la presencia de aminoácidos no usuales en su composición (lantionina y β -metil-lantionina), que se generan por modificaciones post-traduccionales como la deshidratación de serina y treonina para dar dehidroalanina y dehidrobutirina respectivamente (McAuliffe *et al.*, 2001). Aunque estos precursores puedan formar parte de la estructura final del lantibiótico, en muchas ocasiones sufren una condensación con el grupo sulfhidrilo de las cisteínas presentes en la molécula, formándose puentes alanina-S-alanina (lantionina) o ácido aminobutírico-S-alanina (β -metil lantionina) (Jung 1991). De acuerdo a sus propiedades estructurales y sus modos de acción los lantibióticos se clasifican en:
 - i) **Tipo A**, péptidos de 2164 a 3488 Da, alargados y catiónicos, de estructura terciaria tipo sacacorchos, anfipáticos y con 2 a 7 cargas positivas. Son capaces de formar poros, que permiten la disipación del potencial de membrana y la entrada de pequeños metabolitos dentro de las células susceptibles.
 - ii) **Tipo B**, péptidos de estructura globular, con tamaños menores que los anteriores comprendidos entre 1959 y 2041 Da, sin carga o cargados negativamente. Actúan alterando la actividad enzimática de las bacterias sensibles, por ejemplo, inhibiendo la formación de la pared celular (McAuliffe *et al.*, 2001). En este grupo también encontramos lantibióticos formados por dos péptidos con actividad cooperativa.

Tabla I-2. Clasificación de las bacteriocinas de clase I.

Clase	Subclase	Ejemplo	Referencias	Microorganismo productor
Clase I	I (Tipo A)	Nisina A	Rogers & Whittier 1928	<i>L. lactis</i>
		Nisina Z	Mulders <i>et al.</i> , 1991	<i>L. lactis</i>
		Epidermina	Schnell <i>et al.</i> , 1989	<i>S. epidermidis</i>
		Lactocina S	Mørtvedt <i>et al.</i> , 1991	<i>L. sake</i>
		Lacticina 481	Piard <i>et al.</i> , 1992	<i>L. lactis</i>
	I (Tipo B)	Mersacidina	Chatterjee <i>et al.</i> , 1992	<i>Bacillus spp.</i>
		Lacticina 3147	Ryan <i>et al.</i> , 1999	<i>L. lactis</i>
		Citolisina	Gilmore <i>et al.</i> , 1994	<i>E. faecalis</i>
		Staphylococina C55	Navaratna <i>et al.</i> , 1998	<i>S. aureus</i>

- o **Clase II:** péptidos (<15 kDa), estables al calor y que no contienen aminoácidos modificados (lantionina) en su estructura primaria, es decir, no sufren modificaciones post-traduccionales. Junto con los lantibióticos es la clase más numerosa de bacteriocinas y la más frecuente entre las BL. Se caracterizan por tener una señal de procesamiento del péptido líder común (-Gly-Gly). En función de homologías en su estructura primaria, espectro de inhibición y número de péptidos componentes pueden subdividirse en 4 subgrupos:

i) **Clase IIa:** péptidos de 36-38 aminoácidos, activos frente a *Listeria*, que mantienen una alta identidad entre las secuencias peptídicas de este subgrupo (40-70 %). Comparten una secuencia consenso en la región NH₂-terminal: -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys- (X es cualquier aminoácido). Dentro de este grupo se encuentran: la pediocina PA-1/AcH de *P. acidilactici*; las sakacinas A y P producidas por *L. sake* algunas bacteriocinas sintetizadas por *Leuconostoc spp.* como la leucocina A y la mesentericina Y105 y las carnobacteriocinas BM1 y B2 de *Carnobacterium piscicola* LV17.

ii) **Clase IIb:** bacteriocinas cuya actividad biológica depende de la acción complementaria de dos péptidos distintos. En este grupo se incluyen la lactococina M y la lactococina G producidas por cepas de *L. lactis*. Otros ejemplos son la lactacina F y la plantaricina S sintetizadas por *Lb. johnsonii* y *Lb. plantarum* respectivamente.

iii) **Clase IIc:** a este grupo sólo pertenece la lactococina B. Su actividad biológica depende del estado reducido de un residuo de cisteína al igual que ocurre con ciertas toxinas tiol-activadas.

iii) **Clase IId:** incluye todas aquellas bacteriocinas que no cumplen alguno de los requisitos exigidos en los grupos anteriores como, por citar algún ejemplo, la

diplococina/lactococina A producidas por *L. lactis*, la carnobacteriocina A y la piscicolina 61, ambas producidas por *C. piscicola*, y la lactacina B sintetizada por *L. acidophilus*.

- **Clase III (No lantibióticos):** proteínas de más de 15 kDa que están constituidas exclusivamente por aminoácidos no modificados y son sensibles al calor. La helveticina J es la principal representante de este grupo, en el que también se incluyen la acidofilucina A, las lactinas A y B y la caseicina 80. Todas ellas producidas por cepas de *Lactobacillus spp.*
- **Clase IV (Bacteriocinas mixtas):** presentan, asociada a la porción peptídica, un componente glucídico o lipídico esencial para su actividad biológica. Como ejemplo de bacteriocinas con fracciones glucídicas podemos citar a la leucocina S y, de las que poseen lípidos, las lactostrepcinas. La lactocina 27 presenta una estructura aún más compleja con motivos de ambos tipos. No obstante, no se ha descrito el mecanismo molecular mediante el cual se produce la unión de los motivos no proteicos.

2.2. Nisina: características y estructura

Desde su descubrimiento y sus aplicaciones como agente inhibidor de microorganismos alterantes en la fabricación de quesos, la nisina ha sido objeto de continuos estudios. Está admitida como conservante alimentario y se produce a escala industrial para su comercialización. Es producida por cepas de la especie *L. lactis*, su producción representa un fenotipo muy extendido y se han aislado *Lactococcus* productores de nisina de ambientes variados como: leche, productos lácteos, vegetales fermentados, productos cárnicos de orígenes muy diversos y leche humana (Martínez *et al.*, 1995; Rodríguez *et al.*, 1995a; Olasupo *et al.*, 1999; Ayad *et al.*, 2002; Beasley *et al.*, 2004). La producción de nisina confiere a *L. lactis* una ventaja selectiva entre otras bacterias.

La nisina A es un péptido catiónico y anfipático de 34 aminoácidos, que se clasifica dentro de la familia de los lantibióticos. Existen variantes naturales de la nisina: Z, Q y U que difieren entre 1, 4 y 12 aminoácidos de la nisina A respectivamente (Mulders *et al.*, 1991; Zendo *et al.*, 2003; Wirawan *et al.*, 2006). La nisina A y nisina Z que difieren entre ellas sólo en el aminoácido 27 (Figura I-7). La frecuencia de cepas productoras de nisina A y Z es aproximadamente la misma (De Vos *et al.*, 1993), lo cual confirma la neutralidad de la mutación de un aminoácido por otro. Este péptido policíclico está compuesto por residuos aminoácidos deshidratados Dha y Dhb (dehidroalanina y dehidroburitina) y cinco anillos de lantionina y/o β -metil-lantionina formados por puentes disulfuro, en su cadena aminoacídica en modificaciones

post-traduccionales que sufre la cadena peptídica a nivel de ribosoma (Rollema *et al.*, 1996; Cotter *et al.*, 2005; Cheigh & Pyun 2005).

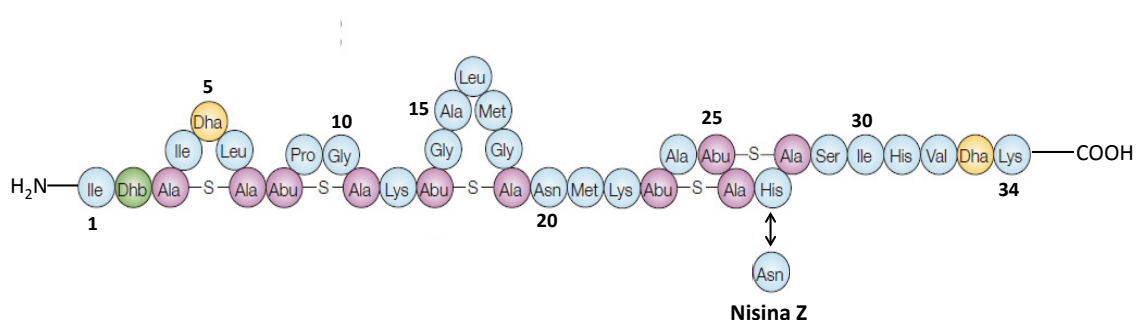


Figura I-7. Estructura primaria de la nisina A. Ala-S-Ala representa el anillo de lantionina, Abu-S-Ala representa el anillo de β -metil-lantionina y los aminoácidos deshidratados: Dha (dehidroalanina) y Dhb (dehidrobutirina). La flecha indica que la sustitución del aminoácido His 27 por Asn27 convierte la nisina A en nisina Z (adaptado de Cotter *et al.*, 2005; Cheigh & Pyun 2005).

La estabilidad, solubilidad y actividad biológica de la nisina depende del pH. La nisina es más estable y soluble a pHs ácidos, por lo cual su aplicación como conservante está favorecida en alimentos ácidos o fermentados. A pH=2 la solubilidad es de 56 mg/ml mientras que a pH=7 disminuye a 1 mg/ml. La estructura sencilla de la nisina le confiere una alta resistencia al tratamiento térmico, soporta el autoclavado, y también disminuye la termorresistencia al aumentar el pH. Debido a su naturaleza peptídica, la nisina se inactiva por la acción de numerosas proteasas como la tripsina y la quimotripsina presentes en el tracto gastrointestinal. También se han descrito unas enzimas inactivadoras específicas o nisininas, producidas por algunas especies de *Bacillus* y *Streptococcus*. Mediante cambios puntuales de los aminoácidos en las posiciones 5, 27 y 31 han dado variantes de la nisina más estables y con mayor solubilidad a pH neutro (Rollema *et al.*, 1995).

2.3. Biosíntesis y producción de nisina

Los genes estructurales de las bacteriocinas van acompañados de otros, necesarios para su expresión y procesamiento y se organizan en operones. Sus funciones han sido investigadas por mutagénesis, transferencia, inactivación/superproducción, y/o por aislamiento y caracterización de sus productos (Klaenhammer 1993). La síntesis de nisina es compleja, y requiere procesos de transcripción, traducción, modificaciones post-traduccionales, secreción y procesamiento de señales celulares muy variadas (Engelke *et al.*, 1992; Montville & Chen 1998). Las bacteriocinas pueden estar codificadas en el cromosoma y en plásmidos (Klaenhammer

1993, de Vuyst & Vandame 1994a). En principio se pensaba que la síntesis de nisina presentaba localización plasmídica (Kozak *et al.*, 1974; Gasson 1984), sin embargo, análisis moleculares establecieron su localización en un transposón conjugativo de 70 kb (Horn *et al.*, 1991; Rauch *et al.*, 1994) con dos lugares específicos de unión con el cromosoma de *L. lactis*.

La biosíntesis de bacteriocinas depende de una estructura genética compuesta generalmente por (Nes *et al.*, 1996): 1) gen estructural: codifica la pre-bacteriocina, aunque en algunos casos existen varios genes estructurales que codifican diferentes componentes de la misma; 2) gen de inmunidad: cuyo producto protege a la célula frente a la bacteriocina y que está relacionado con el gen estructural e incluso forma parte de la misma unidad de transcripción; 3) gen que codifica un transportador ABC que excreta la bacteriocina y cataliza su procesamiento; 4) gen que codifica una proteína accesoria: parece ser esencial para la secreción de la bacteriocina pero su papel es todavía desconocido.

Las bacteriocinas se sintetizan como pre-péptidos inactivos, que contienen un péptido señal en la región N-terminal, y que mantiene a la bacteriocina de forma inactiva dentro de la célula productora, facilitando su interacción con el transportador. En el caso de los lantibióticos es importante para el reconocimiento del pre-péptido por las enzimas que realizan las modificaciones post-traduccionales. El péptido señal puede moverse hacia el espacio periplásmico por las mismas proteínas transportadoras (tipo ABC dependientes del ATP) o por proteínas serina-proteasa presentes en la parte externa de la membrana celular. De esta manera, el extremo carboxilo terminal es separado del péptido líder y es liberado al espacio extracelular representando al péptido biológicamente activo. Las bacterias poseen proteínas que las protegen de la acción de sus propias bacteriocinas. Se han propuesto dos sistemas de protección: 1) una proteína específica que secuestra e inactiva la bacteriocina, o bien se une al receptor de la bacteriocina cambiando su estructura conformacional haciéndolo inaccesible; 2) mediante las proteínas de transporte ABC proporcionan un mecanismo de protección mediante la expulsión de las bacteriocinas que se unen a la membrana.

La nisina se sintetiza inicialmente en el ribosoma como un precursor y después modificaciones enzimáticas generarán la molécula con sus características físicas y estructurales. Finalmente la molécula modificada se transloca a través de la membrana citoplasmática y pasa a su forma madura (Kleerebezem *et al.*, 1997). El sistema de autorregulación de la biosíntesis de la nisina se denomina sistema NICE (Nisin-Controlled Expresión) y la nisina actúa como inductor de su propia síntesis a través de un sistema de 2 componentes: NisK (NisK actúa como sensor para la nisina) y NisR (regulador de respuesta) (Kuipers *et al.*, 1995).

La biosíntesis de nisina está codificada por 11 genes (**Figura I-8**), organizados en 3 operones: *nisABTCIP*, *nisRK* y *nisEFG*, que regulan la expresión del gen estructural *nisA* (Kaletta & Entian, 1989). La transcripción de los genes está dirigida por tres promotores: *PnisA* del operón *nisABTCIP*, *PnisFEG* del operón *nisEFG* (ambos inducibles por la concentración de nisina en el medio) y el promotor constitutivo *PnisRK* del operón *nisRK* (de Ruyter *et al.*, 1996).

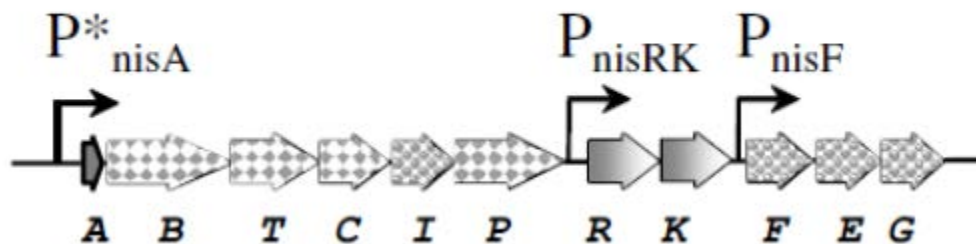


Figura I-8. Representación del operón de genes para la síntesis de nisina (sistema NICE). Las flechas negras indican los tres promotores que regulan la expresión de los genes para la nisina. *PnisA* indica el promotor que controla la expresión de los genes del sistema NICE (Mierau *et al.*, 2005).

A continuación se describe en proceso de síntesis de la nisina y su regulación (Kuipers *et al.*, 1995; Mierau *et al.*, 2005, Khusainov *et al.*, 2015) (**Figura I-9**):

1) En primer lugar tiene lugar la síntesis de la pre-nisina (57 aminoácidos) codificada por el gen *nisA*, que incluye el péptido líder de 23 aminoácidos, y los 34 aminoácidos del extremo C-terminal que después de modificaciones post-traduccionales darán lugar a la nisina madura. El péptido líder es necesario para el transporte de la nisina al exterior celular, y es escindido para que la nisina adquiera su forma activa. El péptido líder sirve como señal de reconocimiento para las enzimas NisB y NisC, para el transportador NisT, para la proteasa NisP, y hace que la prenisina sea inactiva en el interior de la célula.

2) Las modificaciones post-traduccionales son la deshidratación de los residuos de Ser (posiciones 3, 5 y 33) y de Thr (posiciones 2, 8, 13, 23 y 25) daría lugar a la formación de los aminoácidos deshidroalanina y deshidrobutirina, respectivamente debido a la acción de la deshidratasa **NisB** codificada por el gen *nisB*. Por su parte, las cisteínas (posiciones 7, 11, 19, 26 y 28) reaccionarían con los residuos vecinos de deshidroalanina (posición 3) y deshidrobutirina (posiciones 8, 13, 23, 25) para formar anillos: uno de lantionina y cuatro de β -metil-lantionina por acción de la ciclasa **NisC** (Ingram 1970). Las proteínas NisB y NisC están asociadas a la membrana plasmática e interaccionan entre sí y con el transportador ABC codificado por *nisT*. Una vez modificada la pre-nisina es transportada, procesada y secretada.

- 3) La pre-nisina es transportada por **NisT** que es un transportador ABC encargado de la secreción de la pre-nisina al medio extracelular. Si el gen *nisT* está inactivado, *L. lactis* es incapaz de secretar nisina al medio extracelular aunque la sigue produciendo en el medio intracelular.
- 4) Ya en el exterior, **NisP** que es una serín-proteasa mediante proteólisis escinde el líder de la nisina, pasando ésta a su forma activa en el exterior. Si la nisina se libera al medio unida al péptido líder por inactivación del gen *nisP*, es inactiva.
- 5) Para proteger a la célula productora se expresan las proteínas que le confieren inmunidad frente a la nisina. Estas proteínas están asociadas a la membrana y están codificadas por los genes: *nisi*, *nisFEG* (Kuipers *et al.*, 1993; Li & O'Sullivan 2002). Cuando alguno de estos genes se inactiva, se sigue sintetizando nisina, pero las cepas se vuelven mucho más sensibles a ésta (Siegers & Entian 1995).
- 6) La regulación tiene lugar por un sistema de transducción de dos componentes NisK y NisR inducido por la propia nisina. La histidin-quinasa de la membrana citoplasmática **NisK** es la proteína sensora, se une a la nisina madura, y se autofosforila. A continuación NisK transfiere el grupo fosfato al regulador de respuesta **NisR** que se activa e induce la transcripción de los dos promotores: *PnisA* y *PnisFEG*, con lo que se induce la síntesis de la pre-nisina y la inmunidad a ésta. La nisina presente en el citoplasma se adsorbe a la membrana e interactúa con NisK pudiendo desencadenar la transducción de la señal sin necesidad de estar en el medio extracelular (Kylä-Nikkilä *et al.*, 1999).

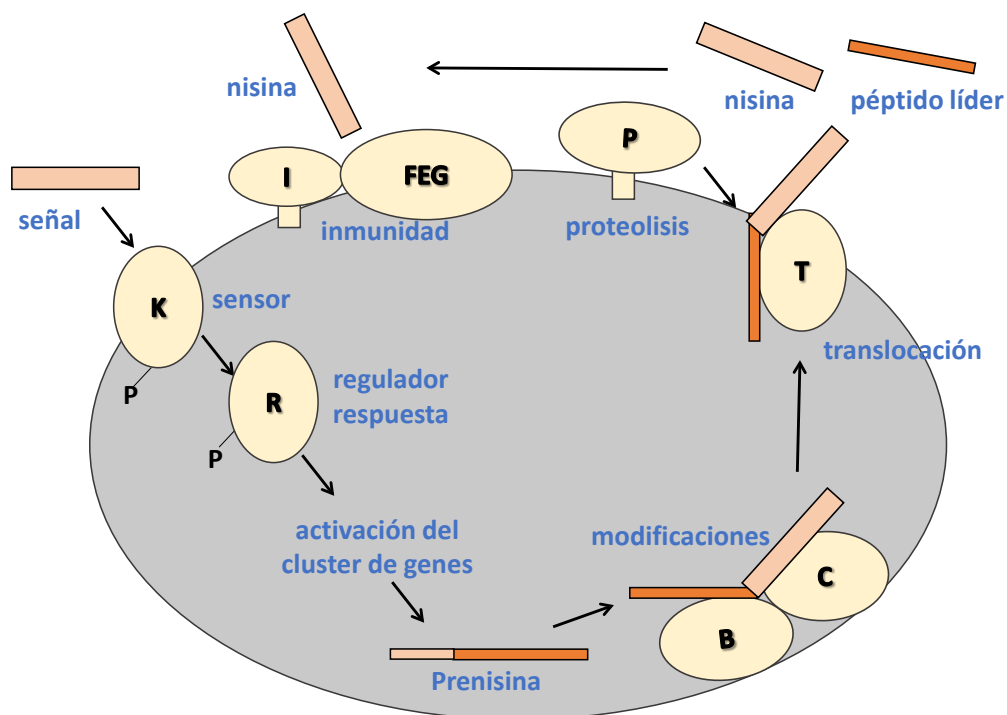


Figura I-9. Esquema del sistema NICE con sus componentes y su función (Kuipers *et al.*, 1995 modificado).

2.4. Modo de acción de la nisina

De manera general, las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas actúan sobre otras especies Gram-positivas, y la nisina es activa frente a bacterias Gram-positivas de una gran variedad de géneros bacterianos: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* y *Mycobacterium*, así como frente a las formas vegetativas y esporas de *Bacillus* y *Clostridium*. Presenta acción inhibitoria sobre los principales géneros de BL presentes en el vino: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Oenococcus*.

El mecanismo de acción de la nisina frente a las bacterias es la formación de poros en las membranas de las bacterias sensibles (Moll *et al.*, 1999), provocando la disipación del potencial de membrana ($\Delta\Psi$) y la pérdida rápida de metabolitos como aminoácidos, nucleótidos y ATP, produciendo la detención del metabolismo celular. La nisina posee una potente actividad *in vivo*, siendo activa en el rango de nanomoles. Su actividad antimicrobiana se inicia mediante su unión al precursor de la síntesis de peptidoglicano, el Lípido II, como paso previo a la formación de poros, e inhibe así la síntesis de la pared celular (Brötz *et al.*, 1998). El estudio de Wiedemann y col. (2001) demostró que la nisina actúa sobre las membranas por dos mecanismos diferentes:

1) A altas concentraciones (rango μM) los poros se formarían sin la participación del Lípido II. La nisina se une a la pared celular de la bacteria sensible mediante atracciones electrostáticas, facilitada por la carga positiva de la nisina y la carga negativa de la pared, para insertarse en la bicapa lipídica por su extremo N-terminal, produciendo una permeabilización y desestabilización de la membrana que deriva en la formación del poro. En este caso para que se produzca una actividad óptima de la nisina, las membranas deben poseer un contenido del 50-60 % de fosfolípidos cargados negativamente, siendo muy importante el extremo carboxi-terminal de la nisina, cargado positivamente, para la unión inicial (Moll *et al.*, 1999). Los poros formados son selectivos para los aniones (**Figura I-10a**).

2) Sin embargo, cuando existe Lípido II disponible, la nisina se une a él siguiendo el modelo de actuación de la **Figura I-10b** y actúa a bajas concentraciones (rango nM).

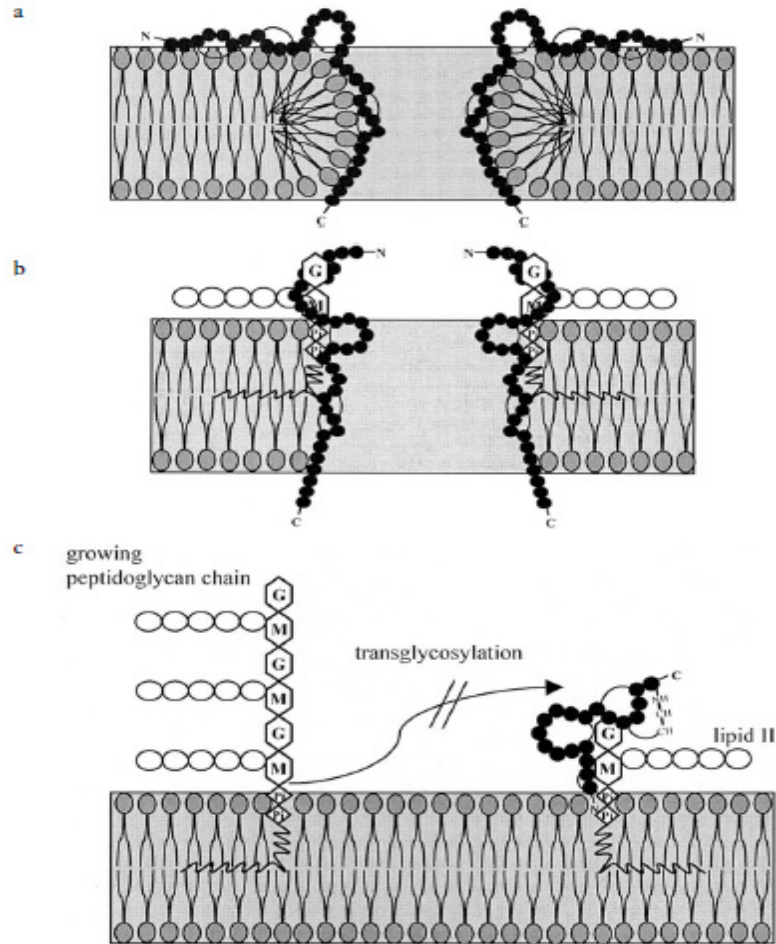


Figura I-10. Mecanismo de acción de los antibióticos de tipo A y B (Hécharad & Sahl 2002). (a) en concentraciones μM los péptidos catiónicos tipo A (nisina) forman una cuña en la membrana para después generar poros independientes. (b) en concentraciones nM la nisina forma poros usando el Lípidio II como molécula diana. (c) unión al lípidio II e impide la incorporación al peptidoglicano, esta acción es intrínseca en la nisina (Wiedemann *et al.*, 2001).

La vida media de los poros, en presencia del Lípidio II aumenta de milisegundos a 6 segundos, e incluso el diámetro de los mismos también se incrementa de 1 a 2,5 μm (Wiedemann *et al.*, 2001; 2004). También se ha observado que la unión de la nisina al Lípidio II favorece el cambio de orientación de la nisina en la superficie de las membranas celulares, pasando de una orientación paralela a una orientación perpendicular respecto a la membrana.

Las bacterias Gram-negativas poseen una elevada resistencia a la acción de la nisina y la razón de que la nisina tenga problemas para actuar frente a las bacterias Gram-negativas es el efecto protector de la capa externa de peptidoglicano característica de bacterias Gram-negativas, la cual protege la membrana citoplasmática. Esta capa externa contiene

glicerofosfolípidos en la parte interior y lipopolisacáridos (LPS) en la exterior. Los LPS están compuestos por una parte lipídica y un heteropolisacárido de carácter aniónico, por lo que se unen fuertemente a superficies hidrofílicas. Sin embargo, la nisina es una molécula hidrofóbica y no puede atravesar la membrana externa, no pudiendo ejercer por tanto su acción (Gill & Holley 2003). Sin embargo cuando las bacterias Gram-negativas se exponen a agentes quelantes como el EDTA (Stevens *et al.*, 1991), se eliminan los cationes que estabilizan la membrana externa, la capa de LPS se pierde parcialmente y la membrana no funciona como barrera a la penetración de la nisina. Como consecuencia, la bacteria es sensible a antibióticos hidrofóbicos como es el caso de la nisina (Helander *et al.*, 2000). Diferentes estudios corroboran este hecho, por ejemplo los estudios de Stevens y col. (1991) y Boziaris & Adams (1999) describen la actividad de la nisina frente a la especie Gram-negativa *Salmonella* y *E. coli* respectivamente, pero sólo cuando la integridad de la membrana se ha visto afectada por agentes quelantes previamente (EDTA) o se añaden junto a la nisina. También se probó en el estudio de Kalchayanand y col. (1992) que bacterias Gram-negativas o incluso Gram-positivas resistentes a la nisina, pueden volverse sensibles a ésta si han sido sometidas a condiciones de estrés por frío, calor o acidez. Recientemente Khan y col. (2015) probaron la inhibición de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (patógenos Gram-negativos) y *Listeria monocytogenes* (patógeno Gram-positivo) mediante la acción de la nisina (125-150 mg/ml) en combinación con Na-EDTA (20 mM) con un pH entre 5 y 6. En el estudio de Brewer y col. (2002) se probó que el etanol actúa de forma sinérgica con la nisina reduciendo la viabilidad de *Listeria monocytogenes*, un patógeno que suele aparecer en alimentos fermentados, sobretodo en quesos.

Los estudios del efecto de la nisina sobre bacterias del vino (Mendes Faia & Radler 1990; Bartowsky *et al.*, 2009; Chun *et al.*, 2000; Rojo-Bezares *et al.*, 2007) demuestran la inhibición de las BL presentes en el vino, siendo *O. oeni* la especie más sensible, y que puede presentar un efecto bactericida si se utilizan concentraciones de nisina superiores a la inhibitoria. Además la acción de la nisina parece no verse afectada por los compuestos fenólicos y polifenoles presentes en el vino (Knoll *et al.*, 2008).

2.5. Aplicación de la nisina en la industria alimentaria

Las bacteriocinas de BL presentan un gran potencial como conservantes de alimentos, por su actividad antimicrobiana específica frente a diferentes bacterias patógenas y alterantes. Las BL poseen el estatus QPS (qualified presumption of safety) otorgado por la EFSA (European Food Safety Authority) europea, lo cual implica que no presentan riesgos de la salud y que han

formado parte de forma natural de la alimentación humana. En algunos casos las bacteriocinas presentan la capacidad de inhibir a potenciales patógenos alterantes asociados con alimentos como: *B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Clostridium* spp. Debido a sus propiedades químicas son resistentes a tratamientos térmicos y cambios en el pH que se producen en la fabricación y procesado de alimentos, siendo su pequeño tamaño beneficioso para la mejor difusión en el alimento.

Únicamente la nisina (Nisaplin, Danisco) y la pediocina PA-1/AcH (ALTA 2431, Quest) han sido comercializadas para ser usadas en alimentación (Cotter *et al.*, 2005). En la búsqueda de nuevas bacteriocinas para su uso en alimentación se consideran diferentes criterios como: 1) la cepa productora debe poseer el estatus QPS; 2) la bacteriocina secretada debe presentar un amplio espectro de inhibición que incluya a ser posible bacterias patógenas; 3) la bacteriocina debe ser estable frente al calor; 4) no debe producir riesgo para la salud; 5) su adición en los productos debe mejorar las cualidades, el sabor y la seguridad del alimento; 6) las bacteriocinas deberían presentar alta actividad específica. Otro factor importante es el pH óptimo para la estabilidad y solubilidad (Delves-Broughton *et al.*, 1996; Kalchayanand *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 1991; Boziaris & Adams 2000, 2001). La nisina está autorizada como conservante en aproximadamente 50 países (Delves-Broughton *et al.*, 1996).

Las bacteriocinas se pueden utilizar en la industria de tres maneras (Schillinger & Holzapfel 1996): 1) Mediante inoculación de los alimentos con la BL productora de bacteriocina, previamente se debe asegurar la capacidad de crecer y producir bacteriocina en esas condiciones; 2) Adición de la bacteriocina purificada o semi-purificada como conservante; 3) Uso de productos previamente fermentados o semi-fermentados por la cepa productora de bacteriocina como un ingrediente en el procesamiento del alimento.

Las principales ventajas que presenta la nisina son:

- Debido a su naturaleza peptídica es degradada por las enzimas digestivas, siendo por tanto inocua para el consumidor y su microbiota intestinal (Barefoot & Nettles 1993).
- Presenta una elevada termorresistencia, lo cual le permite conservar su actividad antimicrobiana tras ser sometidas a temperaturas de pasteurización y esterilización (De Vuyst & Vandamme 1994b).

- Presenta un amplio espectro antimicrobiano frente a diversas bacterias Gram positivas patógenas y algunas Gram negativas. Además se ha demostrado su actividad frente a las bacterias enológicas en su forma planctónica (Rojo-Bezares *et al.*, 2007).
- Es la bacteriocina más caracterizada, de fácil manipulación genética y se encuentra comercializada.
- No presenta toxicidad ni contribuye con olor, color o sabor al producto alimenticio.

En la industria alimentaria se ha utilizado la nisina como bioconservante de productos lácteos (especialmente quesos), productos cárnicos, productos elaborados con huevo líquido, zumos de frutas y alimentos enlatados (Ruiz-Larrea *et al.*, 2007).

2.6. Metabolismo de la arginina en *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis se asocia con la producción de alimentos y su conservación desde hace siglos, es la BL más estudiada relacionada con alimentos y se emplea como iniciador en la industria de productos lácteos fermentados, especialmente en la elaboración de queso. *L. lactis* MG1363 es una cepa libre de plásmidos, obtenida de un fermentado lácteo iniciador, y se encuentra en laboratorios y colecciones de todo el mundo, por ser considerado un prototipo para estudios genéticos y fisiológicos en BL. Respecto a su metabolismo aminoacídico, los aminoácidos que utiliza se pueden clasificar en tres grupos: I) aminoácidos degradados por la ruta ADI (Arg, Glu, Gln y Pro), II) aminoácidos que se pueden convertir directamente a piruvato (Ala, Cys, Gly, Ser) o vía oxalacetato (Asp, Asn y Thr), y III) aminoácidos cuyas vías de degradación no están bien caracterizadas (Ile, Leu, Val, Phe, Trp, Tyr, Lys, His y Met) (Adamberg *et al.*, 2012).

La arginina no es un aminoácido esencial para esta cepa (Wegmann *et al.*, 2007), pero es una rica fuente en nitrógeno. Puede ser sintetizada desde glutamato mediante ocho rutas enzimáticas. Su degradación es completa hasta ornitina, amonio y dióxido de carbono mediante la vía ADI (arginina deiminasa), la cual es catalizada por tres enzimas: arginina deiminasa (ArcA), ornitina carbamoiltransferasa (ArcB) y carbamato quinasa (ArcC). El metabolismo de la arginina en *L. lactis* está regulado por dos reguladores transcripcionales denominados ArgR y AhrC (Larsen *et al.*, 2004). Ambos reguladores transcripcionales se requieren para reprimir la biosíntesis de arginina, mientras que AhrC es el regulador responsable de la activación del catabolismo de la arginina (Larsen *et al.*, 2004).

Las respuestas al estrés de *L. lactis* han sido estudiadas durante años, encontrándose estudios sobre la respuesta a diferentes tipos de estrés: osmótico (Sanders *et al.*, 1998; Zhang *et*

al., 2010), oxidativo (Miyoshi *et al.*, 2003), a condiciones conjuntas de estrés oxidativo y ácido (Cretenet *et al.*, 2011), estrés ácido (Budin-Verneuil *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2011), shock por calor (Kim & Batt 1993) o por frío (Panoff *et al.*, 1994), por la carencia de nutrientes (Price *et al.*, 2012), a la presencia de antibióticos (Dorrian *et al.*, 2011). Se han descrito tanto rutas de respuesta como respuestas cruzadas a diferentes tipos de estrés y relaciones entre rutas.

Para *L. lactis* se había descrito que utilizaba la vía de degradación de la arginina para resistir al estrés oxidativo en la industria quesera (Rochat *et al.*, 2012) y para la generación de energía en situaciones de carencia de azúcares (Brandsma *et al.*, 2012). Sin embargo, no se había descrito la respuesta al etanol de *L. lactis*. En nuestro grupo se realizó un estudio transcriptómico sobre la respuesta de *L. lactis* demostrando la sobre-expresión a nivel transcriptómico de los genes *arcABCDT* en respuesta a la presencia de etanol en el medio de cultivo (Díez *et al.*, 2015, en revisión). Y nuestro estudio será el primero en describir la respuesta metabólica de *L. lactis* al etanol.

A continuación se describe la degradación de la arginina por la vía ADI para *L. lactis* MG1363, ya que en nuestros estudios se utilizó como cepa modelo que es, para realizar el estudio a nivel metabólico de esta ruta.

2.7. Ruta ADI de degradación de la arginina

L. lactis es capaz de sintetizar la arginina a partir de glutamato (**Figura I-11**), y también de degradarla mediante la ruta ADI como se indica en la **Figura I-12**.

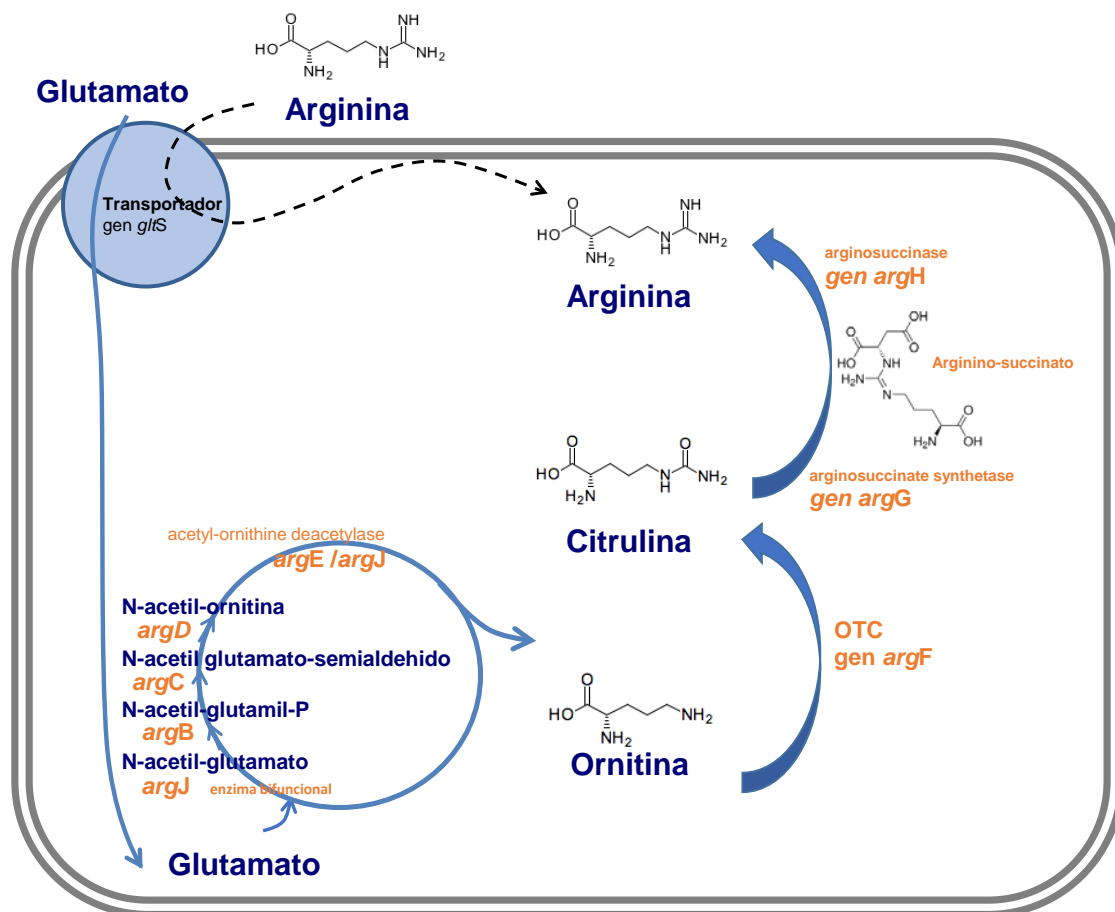


Figura I-11. Síntesis de arginina a partir de glutamato en *Lactococcus lactis*. Fuente: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?llm00330.

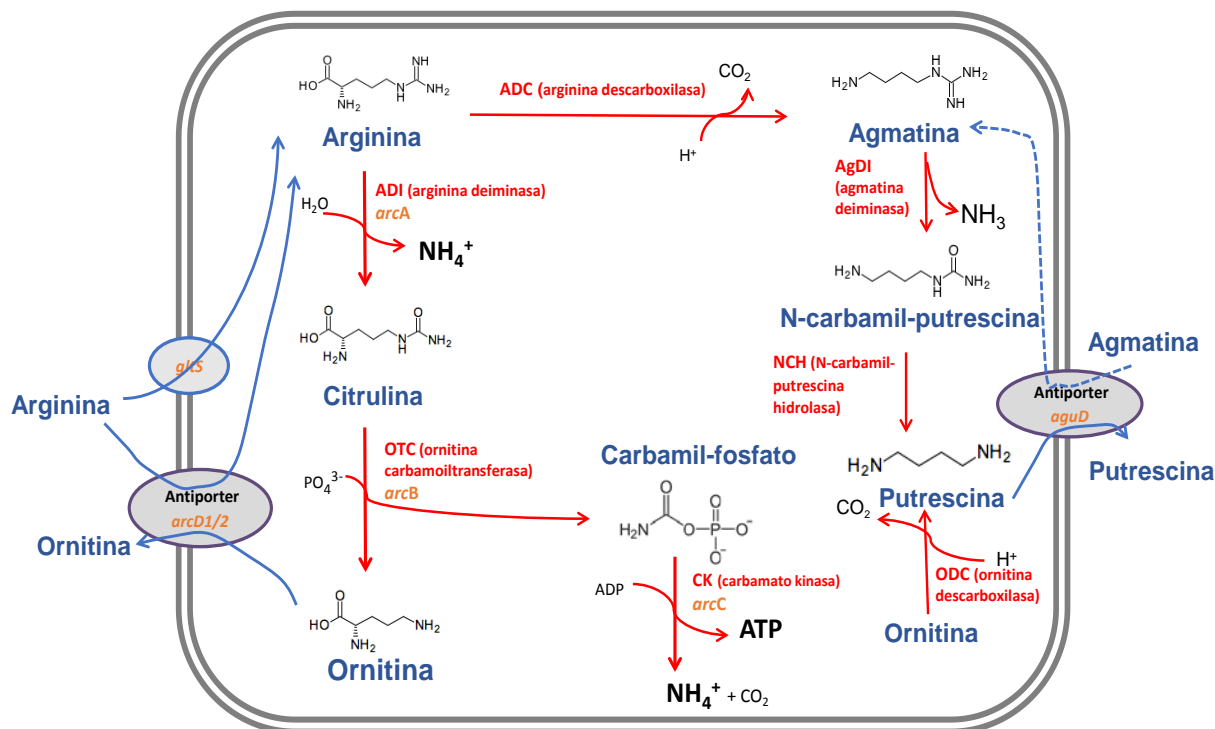


Figura I-12. Degradación de la arginina por la vía ADI en *Lactococcus lactis*. Fuente: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?llm00330.

En la ruta ADI de degradación de la arginina el balance de la reacción por cada mol de arginina es la producción de un mol de ornitina y uno de CO₂, dos moles de amonio y un mol de ATP (Poolman *et al.*, 1987a). En esta reacción actúan tres enzimas en el siguiente orden (**Figura I-12**): ADI (EC 3.5.3.6) arginina deiminasa, que cataliza la desaminación de la arginina, generando citrulina y amonio, con un ligero aumento del pH; OTC (2.1.3.3.) ornitina carbamiltransferasa, cataliza la fosforólisis de citrulina a ornitina y carbamil-fosfato; CK (EC 2.7.2.2.) carbamato quinasa, cataliza la conversión reversible del carbamil-fosfato a CO₂ y NH₃, generando ATP (Larsen *et al.*, 2004; Fernández & Zúñiga 2006). Las enzima ADI y OTC son inducidas por la presencia de arginina en el medio, sin embargo la enzima CK es constitutiva en *L. lactis* subsp. *lactis* y en *L. lactis* subsp. *cremoris* (Crown *et al.*, 1982). Como consecuencia de la degradación de la arginina por esta vía, se produce amonio, que incrementa el pH. Este aumento de pH juega un papel importante para la resistencia de las BL en un ambiente ácido. Como consecuencia de la degradación de arginina se puede generar carbamato de etilo, por reacción de la citrulina generada (**Figura I-12**) con el etanol presente en el medio. También se pueden producir agmatina (vía arginina descarboxilasa) o putrescina por la vía agmatina-deiminasa (**Figura I-12**). El transporte de la arginina está mediado por un transportados que intercambia arginina y ornitina, que es dirigido por la diferencia de gradiente entre el interior y el exterior celular, habiendo sido caracterizado en *L. lactis* (Poolman *et al.*, 1987b).

El metabolismo de la arginina en *L. lactis* está controlada por dos reguladores transcripcionales denominados ArgR y AhrC, que son proteínas hexaméricas complejas pueden reprimir la síntesis de la arginina pero tienen distinta función en la activación del catabolismo (Larsen *et al.*, 2004). En la síntesis de arginina (**Figura I-11**) están implicados los operones *argCJDBF*, *argGH* y *gltSargE*, y todos ellos están reprimidos por la presencia de ambos reguladores, tanto ArgR como AhrC. Sin embargo en el catabolismo de la arginina (**Figura I-12**) actúa un operón: *arcABD1C1C2TD2* el cual se activa por el producto de *ahrC*, de modo que AhrC es el regulador responsable de la activación del catabolismo de la arginina.

Cabe señalar aquí que la arginina es uno de los aminoácidos más importantes en el vino, puede encontrarse desde 100 mg/l hasta 2-3 g/l, y por tanto puede ser metabolizada durante la FML. De hecho, para *O. oeni*, la vía ADI es la ruta de degradación de la arginina más común (Araque *et al.*, 2009). Esta vía metabólica suministra energía, y las cepas que presentan todos los genes involucrados en ella, presentan una ventaja para la supervivencia y crecimiento. Desde el punto de vista enológico, la formación de citrulina como intermediario en la vía ADI de degradación de la arginina podría presentar un problema ya que es precursor del carbamato de etilo, pero si aparece citrulina en el vino, lo suele hacer en bajas concentraciones (Bordons & Reguant 2013).

3. BACTERIAS ACÉTICAS

3.1. Las bacterias acéticas y el vinagre

Tal y como se ha mencionado en apartados anteriores, la BA son bacterias cuyo crecimiento no es deseado en el vino, pero sí para la elaboración del vinagre puesto que es imprescindible que se desarrollen para que transformen el etanol en ácido acético y se obtenga un vinagre de calidad. En los países mediterráneos se produce una gran variedad de vinagres que se emplean como condimento y como agente acidificante muy eficaz para la conservación de alimentos. La elaboración de vinagre se realiza mediante dos métodos bien definidos: a) mediante un proceso lento de cultivo en superficie, también denominado método tradicional, en el cual las BA forman un biofilm en la superficie del vino que tiene el aspecto de una capa grasienta, el denominado "velo" o "madre" del vinagre; y b) mediante una fermentación rápida con cultivo sumergido, o método industrial.

El método tradicional de cultivo en superficie más antiguo se denomina método Orleans o método Pasteur, y recibe su nombre en honor a Louis Pasteur, quien en 1864 demostró que la transformación del vino en vinagre se debía al desarrollo en la superficie de un velo formado por el crecimiento de bacterias, las que él denominó "*Mycoderma aceti*". El método Orleans o Pasteur de elaboración era el empleado por la principal industria vinagrera, que exportaba su vinagre de vino a las Islas Británicas, y que se hallaba en Orleans, donde aún hoy se pueden encontrar testimonios de que se fabricaba vinagre ya desde el siglo XVII (Llaguno & Polo 1991). El método consiste en colocar en un barril de madera un vinagre no pasteurizado y que contiene las BA activas. Progresivamente se va añadiendo vino para que se inicie la fermentación acética dejando siempre un espacio vacío en la parte superior del barril y una abertura para que entre continuamente el aire. La fina capa grasienta del "velo" se mantiene en la superficie y una vez que ha finalizado la acetificación, se extrae la mitad del vinagre del fermentador con cuidado de que el velo no caiga al fondo del barril, y se renueva parcialmente el contenido del barril con más vino (o líquido alcoholizado) para acetificar. El método Pasteur es lento (de 8 a 10 días para conseguir la transformación del vino en vinagre) y su rendimiento bajo, por ello se fueron introduciendo mejoras para conseguir reducir el tiempo de producción del vinagre. El aporte de oxígeno es normalmente el factor limitante para el desarrollo de las BA y la fermentación se lleva a cabo en la interfase aire-líquido, en la cual las BA están en contacto directo con el aire de la atmósfera.

En los vinagres industriales las BA se encuentran sumergidas en el líquido a acetificar y se aplica una fuerte aireación para proporcionar constantemente el oxígeno necesario, resultando ser procesos muy rápidos (24-48 h). Este método es actualmente el más utilizado en la industria del vinagre y además de reducir de forma eficaz el tiempo de producción, alcanzando alrededor de 8-9 grados de ácido acético en 24-48 h (Tesfaye *et al.*, 2002), permite un riguroso control físico-químico de todo el proceso y una uniformidad del producto. Este método surgió en los años 40 para la fabricación industrial de antibióticos y resolvió el problema de las industrias vinagreras a partir del diseño del acetador Frings. En este cultivo sumergido las BA se encuentran en el seno del líquido a acetificar, el cual se satura constantemente de pequeñas burbujas de aire que circulan por convección forzada a través de la biomasa, siendo impulsadas por una turbina que inyecta de forma continua el aire en el fermentador de unos 100-300 hl. De este modo se consigue una elevada población bacteriana y un mayor rendimiento de transformación que en el cultivo en superficie, y ello es básicamente debido a la mayor disponibilidad de oxígeno para las BA. Sin embargo, este método tiene el inconveniente de que un brevísimo periodo de tiempo (1 minuto) sin oxigenación disminuye de forma drástica la actividad y la población bacteriana en estos fermentadores. Requiere una estricta vigilancia de la presión parcial de oxígeno y de parámetros como la temperatura y los ciclos de carga y descarga del acetador (Raspor & Goranovic 2008).

Los vinagres elaborados mediante el método sumergido provienen de sustratos muy variados como son alcohol (proveniente de caña de azúcar, maíz o melazas de remolacha), denominados en la industria como "vinagres de alcohol", o productos fermentados de frutas como son el vino o la sidra, vinagre de malta, de azúcar, arroz, miel, patata... (Budak *et al.*, 2014). El etanol presente en las materias primas proviene de una fermentación alcohólica de un sustrato azucarado (normalmente realizada por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*) en la cual el azúcar se transforma en alcohol (vino, o productos fermentados de frutas u otros sustratos azucarados).

3.2. Taxonomía de las bacterias acéticas

De todas las especies de la familia de *Acetobacteraceae*, las BA descritas en vinagres pertenecen a especies de los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* y el más recientemente propuesto *Komagataeibacter*. En la bibliografía podemos encontrar diversos estudios taxonómicos sobre BA de distintos vinagres: vinagres de arroz (Nanda *et al.*, 2001, Haruta *et al.*, 2006, Fu *et al.*, 2013), vinagres de vino (Ilabaca *et al.*, 2008; Vegas *et al.*, 2010, 2013; Torija *et al.*, 2010; Jara *et al.*, 2013) y vinagres balsámicos (Gullo *et al.*, 2006; De Vero *et al.*, 2006; Gullo & Giudici 2008; Gullo *et al.*, 2009) todos ellos elaborados por el método tradicional. Sin embargo hay menos estudios recientes sobre vinagres elaborados por el método sumergido (Sievers *et al.*, 1992; Sokollek *et al.*, 1998; Boesch *et al.*, 1998; Schüller *et al.*, 2000; Callejón *et al.*, 2008). Cabe señalar que no todas las especies de estos géneros, ni todas cepas de una misma especie tienen la misma capacidad para oxidar el etanol a ácido acético, por lo tanto, a la hora de estudiar la fermentación que tiene lugar en la fabricación de un vinagre es importante identificar a nivel de especie las BA presentes en esa fermentación y diferenciar entre cepas de BA para determinar qué cepas están involucradas en el proceso de fermentación y lideran esta transformación.

La taxonomía de las BA ha evolucionado drásticamente en los últimos años, y de forma resumida podemos decir que desde 1984 el *Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática* recogía todas las claves taxonómicas de estas bacterias e incluía la clasificación usando técnicas moleculares en dos géneros: *Acetobacter* (*A. aceti*, *A. pasteurianus*, *A. liquefaciens* y *A. hansenii*) y *Gluconobacter* (*G. oxydans*). Estos géneros y especies se fueron ampliando, y así por ejemplo en 2008 se describieron 10 géneros y 47 especies de BA (Cleenwerck & De Vos 2008). En el año 2009 la familia *Acetobacteraceae* constaba de 29 géneros reconocidos (disponible en el NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>) (Benson *et al.*, 2009) y esta clasificación siguió modificándose y ampliándose hasta que en 2014 podemos encontrar los 33 géneros descritos en la **Tabla I-3**. En la **Tabla I-4** se detallan las especies de los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* y *Komagataeibacter* que son a los que pertenecen las especies descritas en vinagres y vinos.

Tabla I-3: Géneros descritos en 2014 para la familia *Acetobacteraceae*. Entre paréntesis aparece el número de especies pertenecientes a cada género. Fuente: NCBI (Abril 2014).

GENEROS de la familia <i>Acetobacteraceae</i>	
<i>Acetobacter</i> (26)	<i>Kozakia</i> (3)
<i>Acidicaldus</i> (4)	<i>Lehaibacter</i> (2)
<i>Acidiphilium</i> (124)	<i>Neoasaia</i> (1)
<i>Acidisoma</i> (8)	<i>Neokomagataea</i> (2)
<i>Acidisphaera</i> (8)	<i>Oleomonas</i> (4)
<i>Acidocella</i> (28)	<i>Paracraurococcus</i> (12)
<i>Acidomonas</i> (1)	<i>Rhodopila</i> (2)
<i>Ameyamaea</i> (1)	<i>Rhodovastum</i> (2)
<i>Asaia</i> (77)	<i>Roseococcus</i> (9)
<i>Belnapia</i> (5)	<i>Roseomonas</i> (125)
<i>Commensalibacter</i> (3)	<i>Rubritepida</i> (3)
<i>Craurococcus</i> (3)	<i>Saccharibacter</i> (4)
<i>Gluconobacter</i> (16)	<i>Stella</i> (3)
<i>Gluconacetobacter</i> (15)	<i>Swaminanthania</i> (3)
<i>Granulibacter</i> (5)	<i>Tanticharoenia</i> (1)
<i>Humitalea</i> (1)	<i>Zavarzinia</i> (1)
<i>Komagataeibacter</i> (13)	

Tabla I-4. Especies de los géneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* y *Komagataeibacter*. Entre paréntesis aparece el número de subespecies. Fuente: NCBI (Abril 2014).

<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconacetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>Komagataeibacter</i>
<i>A. calcoaceticus</i>	<i>Ga. aggeris</i>	<i>G. albidus</i>	<i>K. europaeus</i> (3)
<i>A. cerevisiae</i>	<i>Ga. asukensis</i>	<i>G. cerevisiae</i>	<i>K. hansenii</i>
<i>A. cibirongensis</i>	<i>Ga. azotocaptans</i>	<i>G. cerinus</i>	<i>K. intermedius</i>
<i>A. estunensis</i>	<i>Ga. diazotrophicus</i>	<i>G. frateurii</i> (2)	<i>K. kakiaceti</i>
<i>A. fabarum</i>	<i>Ga. entanii</i>	<i>G. japonicus</i>	<i>K. maltaceti</i>
<i>A. farinalis</i>	<i>Ga. johannae</i>	<i>G. kanchanaburiensis</i>	<i>K. medellinensis</i>
<i>A. ghanensis</i>	<i>Ga. liquefaciens</i>	<i>G. kondonii</i>	<i>K. nataicola</i>
<i>A. indonesiense</i>	<i>Ga. maltiaceti</i>	<i>G. morbifer</i>	<i>K. oboediens</i>
<i>A. lambici</i>	<i>Ga. persimmonis</i>	<i>G. nephelii</i>	<i>K. rhaeticus</i>
<i>A. lovaniensis</i>	<i>Ga. polyoxogenes</i>	<i>G. oxydans</i> (5)	<i>K. saccharivorans</i>
<i>A. malorum</i>	<i>Ga. sacchari</i>	<i>G. roseus</i>	<i>K. sucrofermentans</i>
<i>A. nitrogenifigens</i>	<i>Ga. takamatsuzukensis</i>	<i>G. sphaericus</i>	<i>K. swingsii</i>
<i>A. oeni</i>	<i>Ga. tumulicola</i>	<i>G. thailandicus</i> (3)	<i>K. xylinus</i> (3)
<i>A. okinawensis</i>	<i>Ga. tumulisoli</i>	<i>G. uchimurae</i>	
<i>A. orientalis</i>		<i>G. wancherniae</i>	
<i>A. orleanensis</i>			
<i>A. papayae</i>			
<i>A. pasteurianus</i> (6)			
<i>A. peroxydans</i>			
<i>A. persici</i>			
<i>A. pomorum</i>			
<i>A. senegalensis</i>			
<i>A. aceti</i>			
<i>A. syzygii</i>			
<i>A. tropicalis</i>			

En 2012 Yamada y col. realizaron un análisis de secuencias de los genes del rRNA 16S de BA y propusieron una nueva denominación para las especies *Ga. europaeus*, *Ga. hansenii* y *Ga. xylinus* junto con las especies *Ga. swingsii*, *Ga. nataicola*, *Ga. sucrofermentans*, *Ga. intermedius*, *Ga. oboediens*, *Ga. kakiaceti*, *Ga. rhaeticus* y *Ga. saccharivorans*, haciéndolas pasar a un nuevo género que propusieron: *Komagataeibacter*. Sin embargo no parece haber una aceptación unánime de estos nuevos términos y en la actualidad se continúan utilizando en la bibliografía las denominaciones *Ga. europaeus*, *Ga. hansenii* y *Ga. xylinus*. Es por tanto curioso leer en la literatura y en libros de texto que unas de las principales especies responsables de la fabricación del vinagre se encuentran denominadas bajo tres nombres distintos de género: *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* y *Komagataeibacter*.

En la siguiente **Tabla I-5** se muestran las especies de BA descritas en uvas, vinos y en los tipos de vinagres más estudiados, indicando las referencias bibliográficas donde se han descrito.

Tabla I-5. Especies de BA descritas en vino y vinagre.

ESPECIE	MEDIO	REFERENCIA
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	Vino estropeado	Bartowsky <i>et al.</i> , 2003, Bartowsky & Henschel 2008; Du Toit & Lambrechts 2002
	Vinagres de vino elaborado por el método tradicional	Ilabaca <i>et al.</i> , 2008; Vegas <i>et al.</i> , 2010
	Vinagre tradicional balsámico	Gullo <i>et al.</i> , 2006; Gullo & Giudici 2008; Gullo <i>et al.</i> , 2009; De Vero <i>et al.</i> , 2006
	Vinagre de arroz elaborado por el método tradicional	Nanda <i>et al.</i> , 2001; Haruta <i>et al.</i> , 2006
	Vinagre de frutas	Hidalgo <i>et al.</i> , 2012
<i>Acetobacter aceti</i>	Elaboración de vino	González <i>et al.</i> , 2004, 2005; Andorrá <i>et al.</i> , 2008
	Vinagre balsámico tradicional	Gullo <i>et al.</i> , 2006
	Vinagre de sidra	Trcek 2005
<i>Acetobacter malorum</i>	Vinagre balsámico tradicional	Gullo & Giudici 2008; De Vero <i>et al.</i> , 2006
	Vinagre de frutas	Hidalgo <i>et al.</i> , 2012, 2013
<i>Acetobacter oboediens</i> y <i>Acetobacter pomorum</i>	Vinagre de vino y sidra elaborado por el método sumergido	Sokollek <i>et al.</i> , 1998
<i>Acetobacter oeni</i>	Vino estropeado	Silva <i>et al.</i> , 2006

ESPECIE	MEDIO	REFERENCIA
<i>Acetobacter cerevisiae</i>	Uvas	Prieto <i>et al.</i> , 2007
<i>Acetobacter syzygii</i>	Vinagre de frutas	Hidalgo <i>et al.</i> , 2012
<i>Acetobacter tropicalis</i>	Vinagre de vino	Silhavy & Mandl 2006
<i>Gluconobacter oxydans</i>	Elaboración de vino	González <i>et al.</i> , 2004, 2005
	vinagre de vino blanco elaborado por el método tradicional	Vegas <i>et al.</i> , 2010
<i>Gluconacetobacter europaeus</i>	Vinagre elaborado por el método sumergido	Sievers <i>et al.</i> , 1992; Sievers & Swings 2005; Callejón <i>et al.</i> , 2008
	Vinagre de vino elaborado por el método tradicional	Callejón <i>et al.</i> , 2008; Vegas <i>et al.</i> , 2010, 2013
	Vinagre balsámico tradicional	Gullo & Giudici 2008
	Vinagre de frutas	Hidalgo <i>et al.</i> , 2012
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	Vinagre balsámico tradicional	Gullo <i>et al.</i> , 2006
	Vinagre de arroz	Fu <i>et al.</i> , 2013
	Vinagre de vino elaborado por el método tradicional	Vegas <i>et al.</i> , 2010, 2013
<i>Gluconacetobacter intermedius</i>	Vinagre de sidra y alcohol elaborado por el método sumergido	Boesch <i>et al.</i> , 1998
	Vinagre de frutas	Hidalgo <i>et al.</i> , 2012
	Vinagre de vino elaborado por el método tradicional	Vegas <i>et al.</i> , 2013
<i>Gluconacetobacter hansenii</i>	Elaboración de vino	González <i>et al.</i> , 2004, 2005; Andorrá <i>et al.</i> , 2008; Du Toit & Lambrechts 2002
	Vinagre balsámico tradicional	Gullo & Giudici 2008; De Vero <i>et al.</i> , 2006
<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	Elaboración de vino	González <i>et al.</i> , 2004; Du Toit & Lambrechts 2002
<i>Gluconacetobacter saccharivorans</i>	Vinagre de fruta	Hidalgo <i>et al.</i> , 2012
<i>Gluconacetobacter obodiens</i>	Vinagre de vino y sidra elaborado por el método sumergido	Sokollek <i>et al.</i> , 1998
<i>Gluconacetobacter entanii</i>	Vinagre de alcohol elaborado por el método sumergido	Schüller <i>et al.</i> , 2000

*Algunas especies han podido ser renombradas tras su descubrimiento en los medios descritos en esta tabla.

3.3. Técnicas de identificación de bacterias acéticas

3.3.1. Técnicas de identificación taxonómica de bacterias acéticas

Las técnicas para la identificación de BA están en constante evolución y ampliación. La técnica de hibridación DNA:DNA con cepas tipo es la que permite identificar la especie, describir nuevas especies de BA y es la que todavía se utiliza para contrastar con otras técnicas.

Técnicas empleadas para la identificación taxonómica de BA son:

- 1) Hibridación del DNA con sondas específicas para la especie basadas en el gen del codificante del RNA ribosomal 16S. Esta técnica se usa para describir nuevas especies así como método de comparación con otros métodos para asegurar una correcta identificación (Sokollek *et al.*, 1998; Boesch *et al.*, 1998; Schüller *et al.*, 2000; Lisdiyanti *et al.*, 2001; Cleenwerck *et al.*, 2002; Bartowsky & Henschke 2008).
- 2) FISH (Fluorescence In Situ Hybridization): esta es otra técnica basada en la hibridación, en este caso hibridación in situ con sondas fluorescentes que permiten identificar a nivel de especie (Franke *et al.*, 1999; Franke-Whittle *et al.*, 2005).
- 3) Determinación del porcentaje G+C: contenido de guanina y citosina utilizado en la clasificación taxonómica de BA (Yamada & Yukphan 2008).

Sin embargo, estas técnicas no son rápidas ni apropiadas para utilizarlas en el análisis rutinario en el laboratorio de un gran número de muestras. Por eso técnicas más habitualmente utilizadas para la identificación taxonómica de BA son las siguientes:

- 4) PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism): análisis polimórfico de longitud de fragmentos de restricción de amplicones por PCR del gen codificante del RNA ribosomal 16S (Poblet *et al.*, 2000; González *et al.*, 2004, 2005, 2006b; Callejón *et al.*, 2008; Hidalgo *et al.*, 2010; Vegas *et al.*, 2010) y de la región intergénica 16S-23S (Sievers *et al.*, 1996; Trcek & Teuber 2002; Trcek 2005). Se utiliza el análisis combinado de ambas zonas (16S e ITS) para poder diferenciar determinadas especies muy próximas taxonómicamente (González *et al.*, 2006a; Prieto *et al.*, 2007; Cleenwerck & De Vos 2008; Ruiz *et al.*, 2000; Bartowsky & Henschke 2008; Mateo *et al.*, 2014). También se ha utilizado las zonas intergénicas 16S-23S-5S rDNA (Gullo *et al.*, 2006). La técnica de PCR-RFLP también ha sido utilizada sin cultivo previo (Ilabaca *et al.*, 2008; Vegas *et al.*, 2013; Jara *et al.*, 2013; Mateo *et al.*, 2014).
- 5) Amplificación del RNA ribosomal 16S y posterior secuenciación (Prieto *et al.*, 2007; Yamada & Yukphan 2008; Ilabaca *et al.*, 2008; Gullo *et al.*, 2009; Valera *et al.*, 2011).

- 6) Secuenciación de la subunidad I del gen de la alcohol deshidrogenasa (ADH) pyrroloquinolina quinona (PQQ) dependiente (AdhA): enzima que oxida el etanol a acetaldehído (Trcek 2005; Trcek *et al.*, 2007).
- 7) Nested PCR: PCR anidada. Esta técnica es adecuada para poder detectar la presencia de bajas concentraciones de DNA, es decir, especies no predominantes en la muestra (González *et al.*, 2006b).
- 8) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism): polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados del rDNA. Esta técnica presenta alto poder de discriminación de la variabilidad genética y está basada en la restricción del DNA genómico con enzimas y a continuación una amplificación por PCR de alguno de esos fragmentos. (Cleenwerck *et al.*, 2009).
- 9) PCR-DGGE (Denaturing gradient Gel Electrophoresis): electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización de amplicones generados por PCR obtenidos a partir del DNA de muestras sin cultivo (López *et al.*, 2003; Haruta *et al.*, 2006; De Vero *et al.*, 2006; Gullo & Giudici 2008; De Vero & Giudici 2008; Andorrá *et al.*, 2008; Gullo *et al.*, 2009; Jara *et al.*, 2013; Vegas *et al.*, 2013). Esta técnica se usa sin cultivo previo de la muestra.
- 10) PCR-TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis): electroforesis en gel con gradiente de temperatura de fragmentos amplificados por PCR (Ilabaca *et al.*, 2008). Esta técnica se emplea sin necesidad de un cultivo previo de la muestra.

3.3.2. Técnicas de identificación de bacterias acéticas a nivel clonal

En la industria del vinagre la identificación a nivel de cepa es imprescindible, ya que no todas las cepas pertenecientes a la misma especie tienen las mismas características. Para la identificación a nivel de cepa de BA se utilizan las siguientes técnicas:

- 1) ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus): estudio de amplificación de la secuencia de la región repetitiva intergénica consenso de enterobacterias (Versalovic *et al.*, 1991; Nanda *et al.*, 2001; González *et al.*, 2004, 2005; Gullo & Giudici 2008; Gullo *et al.*, 2009; Vegas *et al.*, 2010, 2013; Hidalgo *et al.*, 2010; Mateo *et al.*, 2014).
- 2) REP-PCR (Repetitive Element Palindromic): amplificación de fragmentos repetitivos del DNA bacteriano por PCR (González *et al.*, 2004; Bartowsky & Henschke 2008). Cuando en esta técnica se usa el primer (GTC)₅ es conocida como (GTC)₅-rep-PCR (Versalovic *et*

al., 1994; Gevers *et al.*, 2001; Camu *et al.*, 2007; De Vuyst *et al.*, 2008; Vegas *et al.*, 2013; Mateo *et al.*, 2014).

- 3) RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA): amplificación aleatoria del DNA polimórfico (Trcek *et al.*, 1997; Nanda *et al.*, 2001; Bartowsky *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2007).
- 4) PFGE (Pulsed-field Gel Electrophoresis): electroforesis en campos pulsados de fragmentos de restricción del DNA genómico (López *et al.*, 2007).

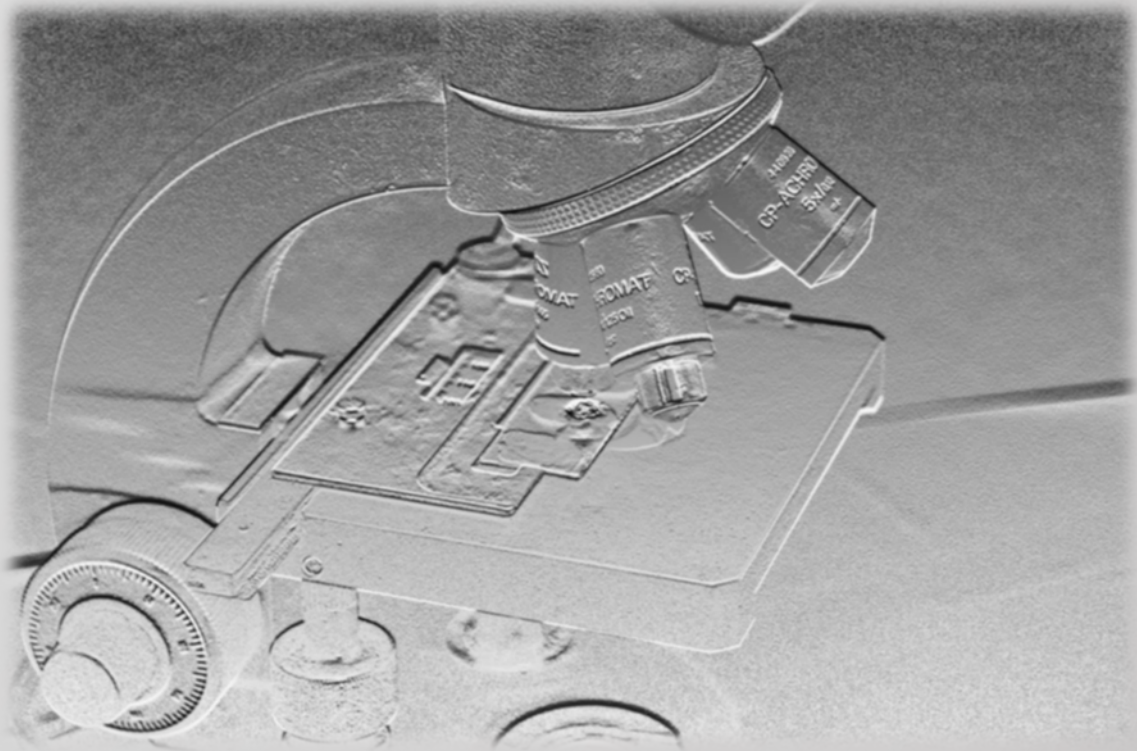
Recientemente ha surgido una alternativa a los métodos basados en el DNA, la técnica MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization con detector de iones basado en Time Of Flight) que genera unos perfiles basados en proteínas, resultando una técnica apropiada para la identificación de bacterias (Sauer *et al.*, 2010; Benagli *et al.*, 2011), En el trabajo de Andrés-Barrao y col. (2013) se utilizó esta técnica para identificar BA de los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Gluconacetobacter* aisladas de vinagres elaborados tanto mediante cultivo en superficie como por el método sumergido. Y en el último año, se ha utilizado la pirosecuenciación, técnica que utiliza la quimioluminiscencia para realizar la secuenciación masiva de poblaciones mixtas bacterianas y conseguir la identificación taxonómica, de este modo se han identificado las especies de los géneros: *Ameyamaea*, *Gluconacetobacter*, y *Komagataeibacter* de BA presentes en biofilms del vinagre de fresa (Valera *et al.*, 2015).

A pesar de que las BA son capaces de crecer en medios con condiciones muy estresantes (pH muy bajos, elevados niveles de alcohol o incluso con bajos niveles de oxígeno), a la hora de cultivar BA en el laboratorio aparecen dificultades debido a diferentes características que presentan estas bacterias. En medios muy extremos pueden encontrarse en un estado denominado viable pero no cultivable (VBNC) (Millet & Lonvaud-Funel 2000; De Vero *et al.*, 2006; Bartowsky & Henschke 2008; Ilabaca *et al.*, 2008), y como hemos visto, también pueden aparecer formando agregados y biofilms. Una alternativa para mejorar su cultivabilidad en el laboratorio es la oxigenación del medio de cultivo para así proporcionar condiciones más favorables para su crecimiento (Millet & Lonvaud Funel 2000). Sin embargo, no parece existir un método de cultivo óptimo, sobre todo cuando las muestras provienen de un medio como el vinagre a partir del cual la recuperación de BA es especialmente difícil (Sievers *et al.*, 1992; Gullo *et al.*, 2006; Torija *et al.*, 2010; Vegas *et al.*, 2010, 2013) y es por ello que las BA del vinagre pueden ser considerados microorganismos fastidiosos (Gullo *et al.*, 2006). Cabe señalar en este

punto que las BA que crecen en placa son representativas de la población real, tal y como demostraron [Vegas y col. \(2013\)](#) comparando los aislados de cultivos con métodos cultivo-independientes. En su estudio los resultados mostraron que la siembra en placa incluso permite recuperar especies que no se podían identificar con las técnicas de cultivo independiente, y confirmaron que la siembra en placa resulta un método adecuado para la determinación de la microbiota del vinagre. Por otro lado, la selección de las cepas de BA más adecuadas y mejor adaptadas para la producción de vinagre estará siempre restringida a aquellas cepas que son cultivables, y por lo tanto que puedan ser crecidas en un fermentador para obtener la biomasa suficiente para ser utilizadas como cultivos iniciadores de la fermentación acética y la elaboración del vinagre.

Para la industria del vinagre es muy importante conocer el microorganismo que está llevando a cabo sus fermentaciones, tanto a nivel de especie como de cepa, ya que de las BA que lideran el proceso dependerá que éste se realice de forma óptima y que se obtenga un vinagre de unas determinadas características. Igualmente, para la elaboración de vino, la identificación de las BL que lideran el proceso de la FML y el control microbiológico de todo el proceso son factores muy importantes para la obtención de vinos de calidad.

El uso de cultivos iniciadores seleccionados para la fermentación, tanto para la elaboración de vinos como para la elaboración de vinagres permite el control del proceso y poder predecir y asegurar la calidad y reproducibilidad del producto, mejorando con ello la calidad del producto final.



Objetivos

Objectives

OBJETIVOS

Los objetivos que se plantearon para la realización de esta tesis fueron los siguientes:

1. Poner a punto un método eficaz y rápido para la cuantificación de bacterias acéticas responsables de la fermentación acética del vinagre.

2. Realizar la identificación taxonómica de bacterias acéticas de muestras en plena fermentación acética de vinos, sidras y alcohol etílico por el método sumergido.

3. Poner a punto métodos basados en el análisis del DNA para la identificación a nivel clonal de las cepas de bacterias acéticas, y realizar la identificación de las bacterias responsables de la producción de vinagre a nivel industrial por el método de elaboración sumergido.

4. Ampliar la colección de bacterias de origen enológico del Departamento de Agricultura y Alimentación de la Universidad de La Rioja con bacterias acéticas responsables de fermentaciones acéticas.

5. Estudiar la capacidad de formar biofilms de bacterias de origen enológico, previamente aisladas de uvas, mostos, vinos y vinagres.

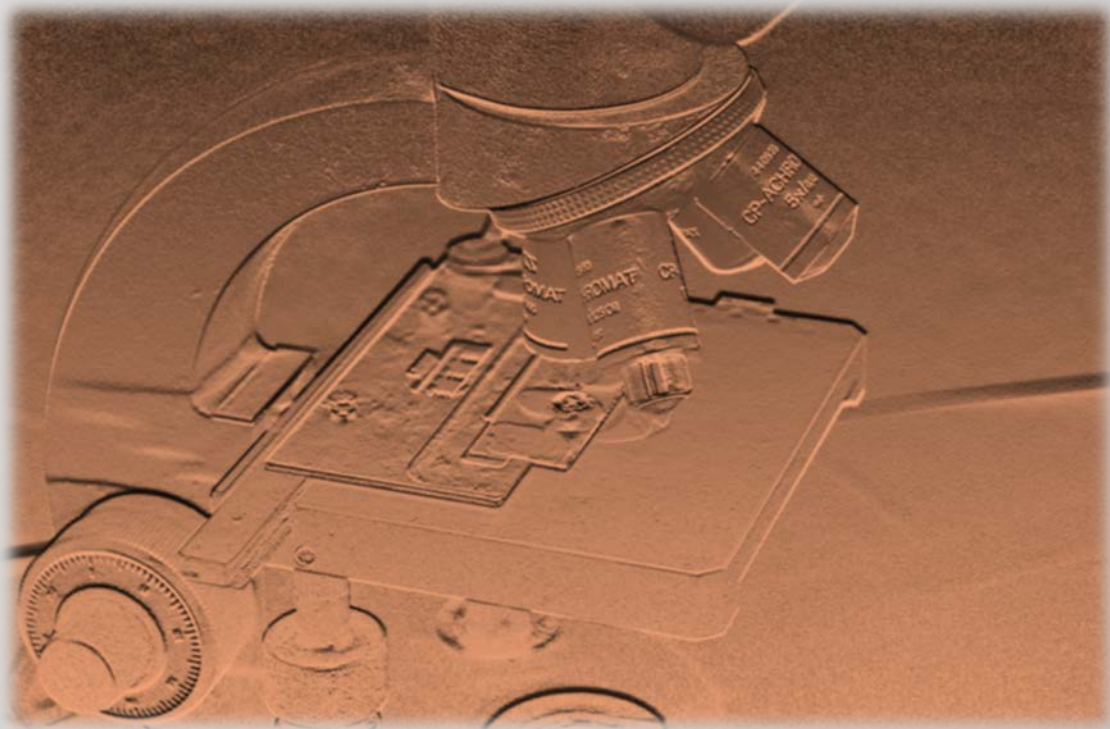
6. Obtener nisina a partir de una bacteria láctica productora con estatus QPS (qualified presumption of safety) por la EFSA y estudiar la posibilidad de utilizar la nisina en el ámbito enológico como agente antimicrobiano y contra la formación de biofilms no deseados de bacterias.

7. Realizar el estudio del metabolismo aminoacídico de la bacteria láctica productora de nisina y su respuesta a la presencia de etanol, con especial interés en el metabolismo de la arginina y la posible generación de aminas biógenas.

OBJECTIVES

The objectives proposed for this thesis were the following:

1. To establish an efficient and rapid method for the quantification of acetic acid bacteria (AAB) responsible for the acetic fermentation of vinegars.
2. To carry out the taxonomic identification of AAB from samples in submerged full acetic fermentation of wines, ciders and ethanol.
3. To establish DNA-based methods for AAB clonal identification, and to analyse the bacterial strains responsible for vinegar industrial production by the submerged method.
4. To enlarge the wine bacteria collection of the Department of Food and Agriculture of the University of La Rioja, with additional AAB strains responsible for acetic acid fermentations.
5. To study the biofilm-forming potential of bacterial isolates of oenological origin previously recovered from grapes, musts, wines and vinegars.
6. To obtain nisin from a lactic acid bacteria (LAB) with the QPS (qualified presumption of safety) by the EFSA, and to study the potential use of nisin in the oenological context as an antimicrobial agent and against the formation of undesired bacterial biofilms.
7. To study the amino acid metabolism of the nisin producer LAB strain and its response to ethanol, with special attention to arginine metabolism and the potential production of biogenic amines.



Materialles y Métodos

Materials & Methods

1. MEDIOS Y METODOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS LÁCTICAS Y ACÉTICAS

1.1. Medios y condiciones de cultivo de bacterias acéticas

- **GY-líquido:** Glucosa Yeast-Extract → medio con los siguientes componentes: 5 % glucosa (Panreac Química S.A., Barcelona) y 1 % extracto de levadura (Scharlau Chemie S.A., Barcelona). Este medio fue utilizado para el aislamiento de BA provenientes de vinagre de alcohol.
- **GY-agar:** medio GY con 1,5 % agar (Becton-Dickinson, Francia) → medio utilizado para el aislamiento de BA de vinagres industriales.
- **GY-agar con CaCO₃:** medio GY-agar con 3 % de CaCO₃ → medio utilizado para la siembra de BA y comprobación de la producción de ácido acético mediante la formación de un halo.
- **Manitol-agar:** componentes: 25 g/l n-mannitol (Sigma-Aldrich Chemie, Alemania), 5 g/l extracto de levadura (Scharlau Chemie), 3 g/l peptona (Becton-Dickson), 15 g/l agar (Becton-Dickson) → utilizado para el aislamiento de BA.

Estos 4 medios fueron utilizados para el cultivo de BA y las condiciones de incubación para estas bacterias fueron en aerobiosis a 30°C durante 3-5 días.

1.2. Medios y condiciones de cultivo de bacterias lácticas

- **MRS-agar:** Man, Rogosa and Sharpe agar (Scharlau, Scharlab, S.L., Barcelona, España) → utilizado para el crecimiento en placa de BL (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*). Sus condiciones de incubación fueron a 30°C en estufa de CO₂ (5 % CO₂) durante 48 horas. En el caso de *O. oeni*, la incubación fue en jarra de anaerobiosis con sistema de generación de atmósfera anaerobia (9-13 % CO₂, Anaerogen, Oxoid, Hampshire, England) durante 72 horas para favorecer su crecimiento, ya que es más lento que el de las otras BL.
- **MRS-líquido:** Man, Rogosa and Sharpe broth (Oxoid, Hampshire, England) → medio utilizado para el crecimiento de BL. Se utilizó para el estudio de la producción de bacteriocinas. Las condiciones de cultivo se detallarán en el correspondiente apartado.

- **BHI-agar:** Brain Heart Infusion agar (Becton-Dickinson, Sparks, USA) → para el crecimiento de la cepa C2803 *Pseudomonas aeruginosa*, la cual se utilizó como control positivo en la formación de biofilm. La incubación de dicha cepa se realizó durante 24 horas a 37°C y aerobiosis.
- **BHI-líquido:** Brain Heart Infusion broth (Becton-Dickinson, Sparks, USA) → medio de cultivo utilizado para el estudio de la capacidad formadora de biofilm. Las condiciones de crecimiento se detallarán en el correspondiente apartado.
- **MRS modificado:** 52 g/l de MRS-líquido, fructosa (Sigma), 6 g/l, D,L-málico (Sigma) 5 g/l, L-cisteína (Sigma) 0,5 g/l y ajustar pH = 4,2 ± 0.2. En el caso de preparación de medio sólido se añadió además 30 g/l de agar (Becton-Dickson) Se adicionó nistatina (200 µg/ml) para inhibir el crecimiento de levaduras y se colocaron en la tapa de la placa cristales de bifenilo para inhibir el desarrollo de hongos → Este medio se utilizó para el recuento de *Oenococcus oeni* en muestras de vino en plena fermentación maloláctica ya que favorece el crecimiento de *O. oeni*.
- **CDM (Chemical Defined Medium):** medio químicamente definido utilizado para el cultivo de *Lactococcus lactis* MG1363 y sus mutantes, basado en el previamente descrito por [Larsen y col. \(2004\)](#) como medio mínimo para el crecimiento de esta especie. En la **Tabla II-1** se detalla su composición.

Tabla II-1. Composición del medio CDM utilizada en este estudio.

Componente (volumen)	Compuesto	Concentración
Solución basal (870 ml)	Na ₂ -β-glicerolfosfato	21 g
	KH ₂ PO ₄	1 g
disolver en 870 ml de agua la cantidad indicada de los compuestos	(NH ₄) ₃ citrato	0,6 g
	Acetato de sodio	1 g
AMINOÁCIDOS	Alanina	3 g/l
	Arginina	1,55 g/l
80 ml de la disolución stock mezcla de todos los aminoácidos (indicada a la derecha la concentración de aminoácidos en la disolución stock)	Asparagina	4,4 g/l
	Glicina	2,2 g/l
	Isoleucina	2,65 g/l
	Leucina	5,7 g/l
	Lisina	5,5 g/l
	Metionina	1,55 g/l
	Fenilalanina	3,45 g/l
	Serina	4,25 g/l
	Treonina	2,8 g/l
	Valina	4,05 g/l
FUENTE DE CARBONO (20 ml disolución de glucosa stock)	Glucosa	500 g/l
MICRONUTRIENTES (10 ml del stock)	MgCl ₂	20 g/l
	CaCl ₂	3,8 g/l
	ZnSO ₄	0,5 g/l

Componente (volumen)	Compuesto	Concentración
BASES NITROGENADAS (10 ml del stock)	Adenina	1 g/l
	Uracilo	1 g/l
	Timina	1 g/l
	Guanina	1 g/l
VITAMINAS (10 ml disolución stock)	Na-p-benzoato	500 mg/l
	D-biotina	250 mg/l
	Ácido fólico	100 mg/l
	Ácido nicotínico	100 mg/l
	Ca(D+)-pantotenato	100 mg/l
	Piridoxamina-HCl	250 mg/l
	Pyridoxina-HCl	200 mg/l
	Riboflavina	100 mg/l
	Tiamina-HCl	100 mg/l
	DL-6,8-ácido tioico	150 mg/l
Vitamina B12	100 mg/l	

1.3. Monitorización del crecimiento de bacterias lácticas

Las curvas de crecimiento de BL en diferentes medios de cultivo se realizaron mediante la determinación de la absorbancia a 660 nm en los cultivos líquidos, y mediante el recuento de colonias en placa y determinación de las correspondientes UFC/ml. Ambos métodos se describen a continuación:

- Medida de absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech) utilizando una cubeta de cuarzo de 1 mm de anchura (Perkin Elmer, Madrid, España). Se utilizaba el medio de cultivo sin inocular para realizar el blanco, ajustando a cero el espectrofotómetro con este blanco.
- Recuento en placa y determinación de las Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/ml). Se realizaban diluciones seriadas de la muestra en el rango de 10^2 - 10^8 UFC/ml y se sembraban 50 μ l de la muestra para extenderlos utilizando el asa Drigalski en placas de MRS-agar. Se sembraban tres placas con la dilución de la muestra más adecuada para poder contar en placa aproximadamente de 30 a 300 colonias. Las placas se incubaban a 30°C en estufa con un 5 % de CO₂.

2. CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA Y CLONAL DE BACTERIAS ACÉTICAS DEL VINAGRE

2.1. Toma de muestras de vinagre

Las muestras de vinagre se tomaban asépticamente de 7 bioreactores de 30.000 litros (Frings Xuzhou Bio- and Chemical Technology Co., Ltd) optimizados para la producción de vinagre mediante el método sumergido por la empresa Vinagreras Ríojanas S.A. Los muestreos se realizaron durante un periodo de trece meses consecutivos. Los bioreactores muestreados contenían vinagres de vino (blanco y tinto), sidra o etanol proveniente de la fermentación de melazas de remolacha (para obtener lo que se conocen en la industria como "vinagres de alcohol"), en pleno proceso de acetificación. Las fermentaciones acéticas realizadas en la empresa tardaban de 1 a 2 días en completarse dependiendo del volumen a fermentar y del tipo de vinagre a elaborar. Las velocidades de reacción eran de 0,17-0,34 grados acéticos/hora; alcanzando finalmente los siguientes grados acéticos: 13-14 grados para vinagres de vino, 6 grados acéticos en vinagres de sidra, y 12-14 para vinagres de alcohol. En el caso de los vinagres de alcohol, el etanol comprado por la empresa, se diluía y posteriormente se realizaba la fermentación acética, de modo que el contenido de ácido acético alcanzaba valores máximos en el rango de 12 a 14 grados de ácido acético. La rápida acetificación que se realizaba presentaba rendimientos muy altos (hasta el 94 %) en la transformación de alcohol en ácido acético.

En las dependencias de la empresa se ubicaban dos tipos de fermentadores: el denominado "arrancador" en el cual el alcohol no se agotaba del todo y servía para comenzar la fermentación en otro acetador "sacador" donde se finalizaba el proceso de acetificación hasta agotar el nivel de alcohol y de donde se extraía el vinagre ya terminado. Las fermentaciones en el acetador denominado "arrancador" se realizaban de forma discontinua con ciclos de carga y descarga, para impedir que las BA pudieran metabolizar el ácido acético, transformándolo en CO₂ y H₂O. Se descargaba el 40-45 % del vinagre generado y se reponía con nueva materia prima. Todo el proceso se encontraba totalmente automatizado con dispositivos de control de los ciclos de carga/descarga, la temperatura y la aireación.

Todas las muestras se tomaron cuando las fermentaciones estaban en fase estacionaria, durante la cual la velocidad de fermentación se mantenía constante, y en diferentes ciclos de la fermentación, es decir, después de vaciar los tanques, volver a llenarlos con nueva materia prima en un nuevo ciclo de fermentación, y al alcanzar de nuevo la fase estacionaria en los acetadores de donde se extraía el vinagre ya terminado (sin etanol).

En total se estudiaron 59 muestras: 34 de vinagres de vino blanco y de vino tinto, 20 de vinagre de sidra y 5 de vinagres de alcohol, durante el periodo de noviembre de 2007 a diciembre de 2008. Se tomaban muestras de 25 ml del acetador desde el grifo toma-muestras (desechando los primeros 200 ml aproximadamente) en tubos estériles de 50 ml y eran transportados al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de La Rioja con agitación continua para favorecer las condiciones aeróbicas. Las muestras se procesaban rápidamente (10 minutos después de su recogida) para su análisis microbiológico en el laboratorio. En la toma de muestras se tomaban los datos de los siguientes parámetros: velocidad de fermentación (grados acéticos/hora), grados acéticos, grados alcohólicos, número de fermentador, hora de toma de muestra, tipo de vinagre, temperatura y volumen total del vinagre en fermentación dentro del acetador.

Cada muestra de vinagre fue sometida al conteo de células siguiendo el método de microscopía de fluorescencia, sin cultivo previo, descrito a continuación. También se sembraron las muestras en placas de medio de cultivo GY, se tomaban 3 aislados de cada muestra y se reislaba hasta obtener un cultivo puro. Se obtuvieron 157 aislados purificados y se identificaron 90 a nivel de especie mediante amplificación por PCR de la región intergénica espaciadora del operón codificante de los rRNA 16S-23S según se describe a continuación. 90 de los aislados obtenidos fueron estudiados mediante ERIC-PCR y 77 aislados se estudiaron mediante digestión con *SpeI* y PFGE para la identificación a nivel de cepa.

2.2. Cepas modelo de bacterias acéticas utilizadas en el estudio

En este estudio se utilizaron 3 cepas de BA pertenecientes a la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) y 18 pertenecientes a la colección de la Universidad de La Rioja, todas ellas se indican en la **Tabla II-2**.

Tabla II-2. Cepas control de bacterias acéticas utilizadas en este estudio.

NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
C-656	<i>Acetobacter aceti</i> (C)	I-34	<i>Gluconobacter oxydans</i> (UR)
C-657	<i>Gluconobacter oxydans</i> (C)	I-38	<i>Gluconobacter oxydans</i> (UR)
C-658	<i>Acetobacter pasteurianus</i> (C)	I-39	<i>Gluconobacter oxydans</i> (UR)
IS-286	<i>Acetobacter pasteurianus</i> (UR)	IS-227	<i>Acetobacter pasteurianus</i> (UR)
IS-289	<i>Acetobacter pasteurianus</i> (UR)	IS-245	<i>Acetobacter pasteurianus</i> (UR)
IS-291	<i>Acetobacter orleanensis</i> (UR)	V3	<i>Gluconobacter oxydans</i> (UR)
IS-293	<i>Acetobacter orleanensis</i> (UR)	I7	<i>Gluconobacter oxydans</i> (UR)
IS-294	<i>Acetobacter orleanensis</i> (UR)	IS-223	<i>Acetobacter pasteurianus</i> (UR)
IS-242	<i>Acetobacter orleanensis</i> (UR)	IS-240	<i>Acetobacter pasteurianus</i> (UR)
IS-259	<i>Acetobacter orleanensis</i> (UR)	IS-269	<i>Acetobacter pasteurianus</i> (UR)
IS-282	<i>Acetobacter orleanensis</i> (UR)		

(C): Cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT); (UR): Cepas de bacterias acéticas aisladas de vino pertenecientes a la colección de la Universidad de La Rioja.

2.3. Cultivo de las muestras de vinagre

Las muestras de 25 ml de vinagres de vino y sidra se centrifugaban durante 10 minutos a 2.100 x g (Megafuge Heraeus, Thermo Scientific, Wilmington, USA). Se recogía aproximadamente 1 ml del precipitado de células, 100 µl de cada muestra eran extendidos en placas de medio GY agar con ayuda de un asa Drigalski y se incubaban a 30°C durante 5 días en aerobiosis. Para el aislamiento de las BA de las muestras de vinagre recogidas se ensayaron los siguientes medios de cultivo descritos en la bibliografía para el crecimiento de BA: GY-agar, GY-líquido, GY-agar con CaCO₃, manitol-agar y MRS-agar. Se probaron diferentes modificaciones del medio GY agar con el fin de asemejar el medio en la medida de lo posible a las condiciones de crecimiento de las bacterias en el vinagre, así se probó el medio con la adición del 10 % de etanol y 10 % de ácido acético y se variaron las concentraciones de glucosa: 1, 2,5 y 5 %.

Las muestras de vinagres de alcohol requerían un paso previo de cultivo en medio líquido antes de ser cultivadas en placas de GY-agar. Las muestras de 25 ml de vinagre de alcohol se centrifugaban, 100 µl de los precipitados de células se resuspendían en 100 ml del medio GY-líquido y se incubaban durante 48 horas a 30°C con agitación continua y vigorosa (incubador Innova 4000, New Brunswick Scientific). Estas muestras cultivadas en el medio líquido eran seguidamente centrifugadas a 2.100 x g durante 10 minutos, el precipitado de células se resuspendía en 1 ml de medio de cultivo y se sembraba en placas de medio GY agar; de este modo se consiguió que las BA de los vinagres de alcohol se adaptaran al cultivo en el laboratorio y crecieran en colonias sobre una placa de medio sólido GY-agar.

Para todas las muestras de vinagres que presentaban crecimiento en placa formando un manto en la superficie, se realizaba un pase utilizando la técnica de agotamiento por estría; de esta forma se pudieron obtener colonias aisladas. Después de este proceso de aislamiento, se realizaba el análisis morfológico de las células mediante tinción Gram y observación al microscopio óptico. Se tomaban tres colonias con morfología típica de BA de cada muestra de vinagre, siendo seleccionadas al azar y representativas del total de colonias crecidas en las placas de GY agar. Los aislados seleccionados se reaislaban con al menos otros dos pases sucesivos hasta obtener un cultivo puro y posteriormente se guardaban en leche descremada estéril al 20 % (Difco, Becton–Dickinson) a -20°C.

2.4. Recuento de bacterias viables y totales mediante el método rápido de microscopía de fluorescencia

El conteo de células viables y no viables se realizó mediante recuentos en cámara Neubauer usando el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) y examinadas al microscopio de fluorescencia (Axioscop 2 Plus Zeiss, Madrid, España) utilizando el software Photometrics Cool Snap (Photometrics, UK). El kit BacLight se utilizó según las instrucciones del fabricante para la tinción de las bacterias. Este kit consiste en la tinción utilizando las sondas fluorescentes para ácidos nucleicos: Syto 9 con fluorescencia verde y el de fluorescencia roja yoduro de propidio. Dichas sondas difieren en sus características espectrales y en su habilidad para penetrar en las células bacterianas. Syto 9 tiñe toda la población bacteriana uniéndose a su DNA, tanto de bacterias que tienen intacta la membrana citoplasmática como las que la tienen dañada. Sin embargo, el yoduro de propidio penetra sólo en las bacterias que tienen la membrana dañada, desplaza la sonda Syto 9 y la emisión de la fluorescencia es en la longitud de onda del rojo, de modo que en presencia de ambas sondas, las bacterias con la membrana citoplasmática intacta se teñirán con fluorescencia verde, mientras que las bacterias con membranas dañadas estarán teñidas con fluorescencia roja.

Se centrifugaba 1 ml de muestra de vinagre a 2.100 x g (Megafuge Heraeus, Thermo Scientific, Wilmington, USA) durante 10 minutos y el precipitado de células se lavaba con solución salina dos veces, realizando finalmente una suspensión de las células en 1 ml de solución salina. Las muestras así obtenidas se diluían 1:10 para su análisis por microscopía de fluorescencia. Se preparaban las sondas yoduro de propidio y Syto 9 mezclando ambas en cantidades iguales, se añadían 3 µl de la mezcla de sondas a 1 ml de cada muestra y se incubaban durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se tomaban 5 µl de dicha suspensión bacteriana y se

colocaban en una cámara Neubauer para ser examinadas en el microscopio de fluorescencia (Axioskop 2 plus, Zeiss). La toma de fotografías se realizó con el captador de imágenes Photometrics Cool SNAP usando el objetivo de 40 aumentos y detección de la fluorescencia mediante los filtros que seleccionan las longitudes de onda de emisión de 525 nm (emisión color verde de las células teñidas con Syto 9) y de 620 nm (emisión color rojo de células teñidas con yoduro de propidio) para el conteo de células viables y no-viables respectivamente.

2.5. Validación del método de microscopía de fluorescencia con bacterias lácticas en condiciones enológicas

El objetivo de estos ensayos fue validar el método de recuento mediante fluorescencia descrito en el apartado anterior y que había presentado una buena correlación con las velocidades de fermentación de biorreactores industriales en la elaboración de vinagre. Para ello se testó su eficacia comparando los resultados con los obtenidos con el método clásico de recuentos en placa en la monitorización del crecimiento de BL en condiciones de laboratorio y también en condiciones enológicas con el seguimiento de la fermentación maloláctica de vinos de una bodega.

Para el conteo de células viables marcadas con fluorescencia se utilizó el método descrito en el apartado 2.4. anterior en diferentes experimentos donde se realizaron las curvas de crecimiento para diferentes BL (*Lactobacillus plantarum* J51, *Leuconostoc mesenteroides* J32 y *Lactococcus lactis* LM29) bajo diversas condiciones de cultivo con diferentes concentraciones de mosto y/o etanol. Paralelamente se analizaron las UFC/ml utilizando el método clásico de recuento en placas de medio MRS-agar (apartado 1.3.).

Posteriormente se estudió la fermentación maloláctica de la vendimia 2013 en bodegas RODA (Haro, La Rioja) realizando el seguimiento de diferentes barricas que contenían vinos monovarietales en plena fermentación maloláctica, elaborados a partir de uva tempranillo o graciano con diferentes estados de madurez fenólica (media madurez y madurez alta). En este caso el procedimiento para el recuento de bacterias consistía en tomar 1 ml de muestra, se realizaban de tres a cuatro lavados con 1 ml de solución salina para eliminar la materia colorante del vino antes de añadir los fluoróforos para evitar interferencias. No se realizó ninguna dilución de la muestra previa al recuento por fluorescencia. Para los recuentos en placa se utilizó el medio MRS-modificado-agar que favorece el crecimiento de la especie *Oenococcus oeni*.

Finalmente se recopilaron todos los datos y se realizaron representaciones para obtener el ajuste de relación entre los dos métodos más apropiado.

2.6. Identificación taxonómica a nivel de especie

2.6.1. Extracción de DNA, amplificación por PCR e identificación taxonómica

Las BA se cultivaron en placas de agar GY a 30°C durante 5 días en condiciones de aerobiosis. La extracción de DNA se llevó a cabo por el método de lisis rápida como describe [López y col. \(2007\)](#). La concentración de DNA extraído fue medida en el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific).

Para la identificación taxonómica a nivel de especie de los aislados de BA se escogió el análisis por PCR de la región intergénica (ITS) entre los genes de los rRNAs 16S y 23S, la cual es una región que en BA presenta mayor variabilidad que la del gen ribosomal 16S y por tanto permite diferenciar entre especies próximas taxonómicamente que el gen 16S no permite diferenciar. Se utilizó el análisis descrito por [Ruiz y col. \(2000\)](#) que consiste en la amplificación de un fragmento de 675-800 pb de dicha región intergénica, empleando los cebadores ITS1 (ACCTGCGGCTGGATCACCTCC) e ITS 2 (CGGAATGCCCTTATCGCGCTC). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Biometra T3000 Thermocycler (Whatman, Goettingen, Alemania) con los cebadores ITS 1 e ITS 2 sintetizados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). La amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 50 µl, el cual incluía 20 µl de DNA (de concentración comprendida desde 80 a 150 ng/µl), 3 µl de buffer para PCR 10X (Bioline, Londres, Reino Unido), 0,5 µl de cada cebador, 0,2 µl de cada uno de los cuatro dNTPs (dNTP mix Promega), 3 mM MgCl₂ (Bioline) y 1,5 U de Taq polimerasa Biotaq (Bioline). Los ciclos de amplificación incluían: un calentamiento de las muestras durante 5 minutos a 94°C y 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación de los cebadores a 65°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto. Finalmente, las muestras se incubaban a 72°C durante 5 minutos y se mantenían a 8°C hasta su análisis por electroforesis.

Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 1 % (w/v) y las bandas fueron separadas durante 45 minutos a 80 V, 400 mA y 100 W; después se tiñeron con bromuro de etidio (BioRad) y fueron fotografiadas con luz ultravioleta (340 nm) en el transiluminador TS40 (UltraViolet Products) con el captador de imágenes (Image Store 500, Sony-UVP) y el programa informático ChemiGenius (GenSnap de SynGene). Los productos de PCR se secuenciaron en ambos sentidos por la empresa Cogenics (Meylan, Francia).

2.6.2. Análisis informático de secuencias de DNA

Las secuencias de los productos de PCR obtenidas con los primers ITS 1 e ITS 2 en ambos sentidos fueron analizadas mediante las herramientas informáticas Nucleic Acid Sequence Massager (<http://www.attrtron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>) y la herramienta Multiple Sequence Alignment del portal EBI (<http://www.ebi.ac.uk/services>). Se comprobó que coincidieran las secuencias de cadenas complementarias y se subsanaron errores con ayuda de los cromatogramas correspondientes. La secuencia consenso obtenida para cada aislado se comparó con las incluidas en la base de datos GenBank usando el programa BLAST proporcionado por el National Centre for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), obteniéndose de este modo la identificación a nivel de género y especie de los aislados. Una identidad de entre 92-99 % de la secuencia obtenida del aislado con la secuencia del genoma de la BA incluida en el banco GenBank fue considerada como resultado positivo para la identificación de la especie.

2.7. Identificación clonal mediante ERIC-PCR

Se utilizó la técnica de ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) para identificar a nivel de cepa 90 aislados de BA de nuestro estudio obtenidos de vinagres de vino tinto, vino blanco, sidra y alcohol. Las secuencias intergénicas repetitivas de enterobacterias son elementos altamente conservados y ampliamente distribuidos en el genoma bacteriano. La amplificación de los fragmentos comprendidos entre estas secuencias genera perfiles de bandas que nos permiten identificar diferencias entre genomas bacterianos y así poder diferenciar entre cepas.

La extracción del DNA se realizó mediante el método de lisis rápida descrito por [López y col. \(2007\)](#), y las muestras se sometieron a un paso adicional de eliminación de proteínas celulares mediante precipitación ([Sambrook et al., 1989](#)). Para ello se tomaban 100 µl de muestra sobre los que se añadían 200 µl de solución II (0,2N NaOH, 1 % SDS), se mezclaba bien la muestra y se guardaba en hielo durante 3 minutos. Después se añadían 150 µl de solución III (3M potasio, 5M acetato), se agitaba durante 10 segundos en vortex y se mantenía en hielo durante 3-5 minutos. La muestra se centrifugaba a 14.800 x g en una microfuga (Biofuge Heraeus, Thermo Scientific) durante 5 minutos a 4°C. Se recuperaba el sobrenadante en un tubo estéril, se precipitaba el DNA con 2 volúmenes de etanol (96 %) a 4°C y se dejaba reposar en hielo durante 2 minutos. Finalmente se centrifugaba la muestra a 12.000 x g a 4°C durante 5 minutos y se eliminaba el sobrenadante. El DNA precipitado se disolvía en 50 µl de buffer TE (10 mM Tris/HCl pH 8; 1 mM

EDTA pH 8) inactivando posteriormente las DNAsas calentando en un baño de agua a 85°C durante 15 minutos. La cuantificación del DNA se realizó con el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) y se ajustaba su concentración entre 80 y 150 ng/ml.

Los primers utilizados para la amplificación mediante ERIC-PCR fueron los descritos por [Versalovic y col. \(1991\)](#): ERIC1 (5'ATCGAAGCTCCTGGGGATTAC3') y ERIC2 (5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG3') (sintetizados por Sigma Aldrich, Madrid, España) que amplifican fragmentos de 300-3000 pb. La amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 50 µl según las condiciones descritas por [González y col. \(2004\)](#).

Los productos de amplificación se resolvieron en gel de agarosa al 1,5 % (w/v) y se separaron a 80 V durante 1 hora y 45 minutos, tiñéndose con bromuro de etidio (BioRad) y se tomó la imagen mediante la iluminación con luz ultravioleta (340 nm) en el transiluminador TS40 (UltraViolet Products) con el captador de imágenes (Image Store 500, Sony-UVP) y el programa informático ChemiGenius (GenSnap de SynGene).

Los patrones obtenidos en el análisis ERIC-PCR se clasificaron como indistinguibles, relacionados o no relacionados (indistinguishable, closely related o unrelated) cuando los patrones de bandas eran idénticos, se diferenciaban en 1-3 bandas o diferían en más de tres bandas respectivamente, siguiendo los criterios de [Tenover y col. \(1995\)](#).

2.8. Identificación clonal mediante análisis de restricción con la enzima *SpeI* y electroforesis de campos pulsados

La técnica de electroforesis de campos pulsados PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) también se empleó para identificar los aislados de BA a nivel de cepa. La técnica de PFGE consiste en separar fragmentos grandes de DNA mediante una electroforesis con un campo eléctrico que cambia periódicamente de dirección. Esta técnica presenta una buena reproducibilidad entre ensayos y entre diferentes laboratorios. En este caso se separaron los fragmentos de DNA generados tras la digestión del DNA total de la cepa bacteriana con la enzima *SpeI*. Los perfiles de bandas generados para cada aislado se comparaban con el programa GelCompare de Bionumerics, estableciendo de este modo las relaciones genéticas entre los aislados y determinando si se trataba o no de la misma cepa.

El procedimiento utilizado fue puesto a punto en este trabajo, partiendo de un protocolo descrito previamente para BL del vino por [López y col. \(2008\)](#). Se empleó un sistema CHEF (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field) DR II de BioRad (CA, USA).

Este método requiere en primer lugar la inmovilización previa de las células bacterianas en agarosa mediante la preparación de los denominados insertos de agarosa. En segundo lugar se realiza la lisis de las células inmovilizadas en los insertos de agarosa, y tras diferentes lavados, se lleva a cabo la digestión enzimática del DNA con la enzima de restricción adecuada. Se tuvieron que realizar ensayos previos para poner a punto la técnica y determinar: la concentración celular más adecuada y el tiempo de crecimiento bacteriano óptimo, el método eficaz de lisis celular, la elección de la enzima de restricción más adecuada y el estudio de reproducibilidad de la técnica mediante la repetición del proceso con el mismo aislado en diferentes ensayos.

- a) Preparación de los insertos: Partiendo de un cultivo fresco en placa de los aislados puros (2-3 días), se tomaban 2 asas del cultivo y se resuspendían en 10 ml de medio GY líquido para incubarlo durante 24 horas con agitación vigorosa y continua (200 rpm) a 30°C y en condiciones de aerobiosis hasta alcanzar una densidad óptica de 0,8-1,2 a 660 nm. Se tomaban 3 ml del cultivo fresco y se centrifugaban (1.800 x g, 10 minutos), las células se lavaban una vez con 3 ml de solución salina estéril. Después el precipitado de células se resuspendía cuidadosamente en 100 µl de buffer de conservación (10 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) y la suspensión se atemperaba a 50°C (el mínimo tiempo posible) para añadir a continuación a la misma temperatura 100 µl de 1 % agarosa certificada para campos pulsados (D-5 Pronadisa Hispanlab S.A., Madrid, España) en buffer TBE (45 mM Tris, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA pH 8). La suspensión de células y agarosa homogénea se dejaba solidificar en moldes (de dimensiones 10 x 5 x 1,5 mm, BioRad) a 4°C durante 15-20 minutos.

- b) Lísis celular: Se realizó el método de [López y col. \(2007\)](#) para la lisis celular y el aislamiento del DNA inmovilizado en los bloques de agarosa. Para ello los insertos eran introducidos en un tubo estéril donde se les añadía 3 ml de la solución de lisis cuya composición para 100 ml era: 0,6 ml Tris 1M (pH=8), 20 ml NaCl 5M, 20 ml EDTA 0,5M (pH=8), 5 ml Brij 58 (Sigma) 10 %, 2,5 ml sarcosyl [N-lauroylsarcosin de sodio (Sigma)] 20 %, 2 ml ácido deoxicólico (Sigma) 10 % y 49,9 ml agua MiliQ. Por cada mililitro de solución de lisis se añadían 2 mg de lisozima (añadida justo antes de adicionar la mezcla a los insertos). Se incubaban a 37°C durante 2 horas, y después se decantaba el medio. A continuación se añadían 3 ml de solución ESP preparada en el momento de usarla, cuya composición era: 30 ml EDTA 0.5M (pH=8), 1,5 ml sarcosyl 20% y 0,03 g proteinasa K. Los insertos se incubaban a 56°C durante 12 horas, decantando después el medio. A continuación se lavaban los insertos con 10 ml de cada una de las disoluciones siguientes: primero con la

disolución A (Tris 10 mM pH=8 y EDTA 50 mM pH=8) a 56°C durante 15 minutos (1 vez), después con la disolución B (Tris 10mM pH=8 y EDTA 50mM pH=8) a temperatura ambiente durante 30 minutos y con agitación (2 veces), y finalmente con la disolución C (Tris 10 mM a pH=8) durante 30 minutos y con agitación a temperatura ambiente.

- c) Digestión con la enzima de restricción: Antes de la digestión con la enzima de restricción, se cortaban los bloques de agarosa (porciones de 1-2 mm) y se equilibraban durante 30 minutos a temperatura ambiente en 100 µl del buffer enzimático apropiado. Se ensayaron diferentes endonucleasas de restricción: *SfiI*, *XbaI*, *NotI*, *AluI*, *SmaI* y *SpeI* (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts). Se realizaron las digestiones con *SpeI* añadiendo sobre la muestra 100 µl de buffer enzimático específico (proporción BSA/buffer 10X = 1/10) conteniendo 5 U de la enzima de restricción e incubando durante la noche a 37°C. Antes de cargar los bloques en el gel, se lavaban con 1 ml de TBE 0,5X (TBE 5X: 54 g/l tris(hidroximetil)aminometano; 27,5 g/l ácido bórico; 20 ml EDTA 0,5M pH 8) durante 8 minutos a 52°C para eliminar los restos de enzima.
- d) Electroforesis de campos pulsados: Se analizaron mediante la técnica de PFGE 77 aislados. Los fragmentos de DNA se separaron en un gel de agarosa (D-5 Pronadisa) al 1 % (w/v) en TBE 0,5X buffer con un sistema CHEF DR II (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) conteniendo tampón TBE 0,5X. La electroforesis se realizó en buffer TBE 0,5X con bombeo constante, a 14°C, con un voltaje constante de 4,5 V/cm y una rampa de 5 a 45 segundos durante 24 h. El marcador de pesos moleculares utilizado fue el Lambda ladder PFG marker (New England Biolabs). Para la visualización, los geles se tiñeron por inmersión con bromuro de etidio (0,5 mg/ml) durante 10 minutos y fueron fotografiados bajo luz UV. Se continuó destiñendo en agua hasta la obtención de la foto de mejor calidad.

Los patrones de bandas obtenidos se clasificaron, como en el caso de los perfiles de ERIC-PCR, como indistinguibles, relacionados o no relacionados cuando los perfiles eran idénticos, diferían en 1-3 bandas, o diferían en más de tres bandas respectivamente, según los criterios publicados para la clasificación clonal (Tenover *et al.*, 1995).

2.9. Estudio de reproducibilidad y análisis numérico de las imágenes obtenidas en las técnicas ERIC-PCR y PFGE

Para poder discriminar entre cepas y determinar el porcentaje de similitud entre cepas distintas, se realizaron estudios de reproducibilidad según describe [López y col. \(2008\)](#). Las imágenes de bandas obtenidas en repeticiones realizadas para un mismo aislado se incluyen dentro del dendrograma con las imágenes obtenidas para todas las cepas. El porcentaje de similitud obtenido para las repeticiones del análisis de ese aislado se establece como el valor de corte por debajo del cual se consideran patrones de bandas distintos y pertenecientes a cepas diferentes.

Se utilizó el software GelCompar 2.5 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) para la conversión, normalización, y posterior procesamiento de las imágenes. Se realizó la comparación de los perfiles de bandas obtenidos por PFGE y por ERIC-PCR empleando el coeficiente de Dice. El software GelCompar se basa en el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Arithmetic average) para generar los dendrogramas.

Se utilizaron dos parámetros para la comparación de las técnicas utilizadas (ERIC-PCR y PFGE):

- El coeficiente de correlación cofenética, calculado por el programa GelCompar a partir de las distancias representadas en el dendrograma. Este parámetro es una medida de la fiabilidad de las distancias filogenéticas mostradas en los dendrogramas ([Sokal & Rohlf 1962](#)).
- El índice de diversidad genética se calculó del siguiente modo: $100 \times (\text{número de patrones diferentes} / \text{número total de aislados})$.

3. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LAS BACTERIAS PARA FORMAR BIOFILM

3.1. Cepas para el estudio de la capacidad de formación de biofilm

Se analizaron 69 cepas de BL y 11 BA pertenecientes a 13 especies diferentes, y como control positivo para la formación de biofilm se utilizó la cepa *Pseudomona aeruginosa* C2803. Las cepas estudiadas fueron de origen enológico (uva, mosto y vino) provenientes de vinos de la D.O.Ca. Rioja y de vinagres, y todas ellas pertenecientes a la colección de la Universidad de La Rioja. Además se incluyó la cepa *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LM29 de origen lácteo en este estudio. Todas las cepas utilizadas se muestran en la siguiente **Tabla II-3**.

Tabla II-3. Bacterias utilizadas en el estudio de la capacidad formadora de biofilm.

BACTERIAS LÁCTICAS			
Especie	Nº cepas	Nombre de las cepas	Origen (Año/Localidad)
<i>Lactococcus lactis</i>	1	LM29	Lácteo, leche materna*
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	11	J37, J43 J32, J41 J47 J48, J49 J57 V5 J46 J38	Mosto (1994 Villalba)* Uva (1994 Cenicero)* Mosto (1995 Oyón)* Vino (1995 Oyón)* FML Tumultuosa (Murillo)* Encubado* Mosto (1995 El Redal)* Vino (1994 Agoncillo)*
<i>Pediococcus acidilactici</i>	2	IS111 J83	FML Tumultuosa (1999)* Vino (1995 Tirgo)*
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	J48	Vino (1994 Villalba)*
<i>Lactobacillus brevis</i>	1	J54A	UR
<i>Lactobacillus paracasei</i>	2	J52, J60	UR
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	2	J80, J81	Vino (1995 Tirgo)*
<i>Pediococcus parvulus</i>	2	J103, J82	Vino (1995 Tirgo)*
<i>Lactobacillus plantarum</i>	35	E3, E14 E8 I3 J21, J23 J34, J39 J36 J51, J61 J53, J55, J56, J58, J59, J63, J75, V6 J62, J67, J69, J70, J71, J73 J77, J78 T19, T20, T53, T6	24h encubado (1998)* Descubado (1998)* Mosto 1998* Mosto (1994 Agoncillo)* Vino (1994 Agoncillo)* Mosto (1994 Villalba)* Vino (1995 Oyón)* Vino* Vino (1995 Tirgo)* Vino (1995 El Redal)*

Especie	Nº cepas	Nombre de las cepas	Origen (Año/Localidad)
<i>Lactobacillus plantarum</i>		Y8, Y17, Y21, Y22	Fin FML (1998)* Mosto (1999 CIDA)*
<i>Oenococcus oeni</i>	12	IS1, IS11, IS14, IS16, IS44, IS45 IS144, IS145, IS151, IS166, IS177, IS196	FML Tumultuosa (1999)* Fin FML (1999)*
BACTERIAS ACÉTICAS			
Especie	Nº cepas	Nombre de las cepas	Origen
<i>Gluconacetobacter europaeus</i>	4	R1, R3 R39, R48	Vinagre de vino blanco (UR) Vinagre de sidra (UR)
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	2	R30, R90	Vinagre de sidra (UR)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	5	R35, R36, R41, R46, R49	Vinagre de sidra (UR)
OTRAS BACTERIAS			
Especie	Nº cepas	Nombre de las cepas	Origen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	C2803	UR

*UR: Colección de la Universidad de La Rioja

3.2. Método para la determinación de la capacidad formadora de biofilm de bacterias lácticas

El objetivo de este estudio fue el medir la capacidad de formación de biofilm de las cepas de BL mostradas en la **Tabla II-3**. Para ello se utilizó el método descrito por O'Toole y col. (1998a) con las siguientes modificaciones:

- Se partía de un cultivo fresco (24 h) en placa (medio MRS-agar para BL y BHI-agar para *Pseudomonas*). Siempre se preparaba un control negativo de medio sin células y como control positivo se utilizó la cepa C2803 *Pseudomonas aeruginosa*.
- Se realizaba una suspensión de la bacteria en solución salina estéril hasta ajustar la absorbancia a 660 nm entre 0,4-0,5 (utilizando una cubeta de 1 mm de ancho).
- Se inoculaban tubos de cristal con 3 ml de BHI líquido (Becton-Dickinson, Sparks, USA), o el medio correspondiente con etanol y/o nisina, con 200 µl de la suspensión bacteriana anterior. Se realizaban todos los ensayos por triplicado.
- Se incubaban las muestras a 23-25°C y sin agitación durante 48 horas.

- Se eliminaba el sobrenadante por decantación con sumo cuidado para no romper el biofilm formado, y dejando secar el tubo al aire bocabajo durante 30 minutos.
- Se lavaba cuidadosamente el biofilm formado dos veces con aproximadamente 6 ml de solución salina. Se dejaba secar entre lavados durante 20 minutos.
- Se dejaba secar completamente durante 1 hora aproximadamente antes de la tinción.
- Se añadían 3 ml de solución cristal violeta al 0,1 % (v/v) y se dejaba 15 minutos.
- Se decantaba el exceso de cristal violeta (con cuidado de no dejar secar el cristal violeta) y se lavaba con agua destilada añadiéndola con cuidado por las paredes del tubo.
- Se repetía el lavado dos veces, de manera cuidadosa para no eliminar el biofilm.
- Se dejaba secar completamente.
- Se añadían 3 ml de etanol para decolorar el tinte retenido en el biofilm y se deja durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se tomaban 200 μ l del sobrenadante (cristal violeta disuelto en etanol) y se medía la absorbancia a 600 nm en cubeta de cuarzo (que es la longitud de onda a la que absorbe el cristal violeta).
- Se consideró que con un valor de $D.O._{600nm} \geq 1$ la producción de biofilm es positiva y para una $D.O._{600nm} < 1$ la producción de biofilm es negativa (O'Toole *et al.* 1998a; Peeters *et al.* 2008).

Este método se basa en la unión del cristal violeta a los polisacáridos del biofilm, después de la tinción el tinte adsorbido se eluye con un disolvente como el etanol y se cuantifica la cantidad de tinte midiendo su D.O. a 600 nm la cual es directamente proporcional al tamaño del biofilm.

3.3. Método para la determinación de la capacidad formadora de biofilm de bacterias acéticas

Para evaluar la capacidad formadora de biofilm de las BA indicadas en la **Tabla II-3** se utilizó un método diferente al indicado en el apartado anterior para BL. La razón fue el pobre crecimiento de las BA en los medios de cultivo líquidos y la labilidad de los biofilms que en algunas ocasiones se observaba en la superficie de los cultivos.

Se realizó la observación macroscópica de la producción de biofilm evaluando lo que se denomina "carácter ropy". Se conoce como carácter o fenotipo "ropy" la capacidad de las cepas

para formar hilos al levantar con un asa de siembra la masa celular crecida sobre un medio de cultivo sólido.

Las cepas de BA fueron crecidas en medio MRS-agar y en medio MRS-agar con 100 µg/ml y 200 µg/ml de nisina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y se evaluó su carácter “ropy” según se acaba de describir.

3.4. Visualización del biofilm al microscopio

Se realizaron pruebas para visualizar fragmentos del biofilm formado mediante tinción con cristal violeta y con las sondas de fluorescencia LIVE/DEAD BacLight (Invitrogen, USA) ya utilizadas en esta tesis y el microscopio de fluorescencia Axioscop 2 Plus (Zeiss, Madrid, España). Para ello se partió de un biofilm de la cepa *L. mesenteroides* J32 ya que resultó ser la que más cantidad de biofilm formaba.

En el caso de la tinción con cristal violeta el biofilm formado en el tubo, se eliminó el medio de cultivo, se dejó secar y se tiñó con 3 ml de cristal violeta. Tras eliminar el tinte, añadimos 1 ml de solución salina y despegamos con cuidado agitando levemente el biofilm que quedó flotando para después cogerlo con una pipeta Pasteur y colocarlo en un portaobjetos para su visualización en el microscopio.

Para la tinción con sondas de fluorescencia, cuando se elimina el medio de cultivo por decantación, se deja secar el biofilm y se añade 1 ml de solución salina, despegando con cuidado el biofilm agitando suavemente. Se añaden las sondas según el método descrito (apartado 2.4.), se recoge con pipeta Pasteur y se coloca en cámara Neubauer para su visualización. Las células con la membrana dañada presentaron fluorescencia roja (teñidas con yoduro de propidio) y las células con la membrana citoplasmática intacta presentan fluorescencia verde (teñidas con el fluoróforo SYTO 9). Ambas sondas se detectan con el filtro simple de emisión a 530 nm (emisión verde) y el filtro de 605 nm (emisión roja) así como conjuntamente mediante el filtro triple (emisión a 460, 520 y 600 nm) el cual permitió observar simultáneamente fluorescencia verde y roja.

3.5. Estudio de la tolerancia de las bacterias lácticas al etanol y a la nisina

Dado el interés que presenta la formación de biofilms como mecanismo de resistencia bacteriana a los antimicrobianos, se realizó el estudio de la tolerancia a los dos agentes antimicrobianos: etanol y nisina, de las BL en forma planctónica (células libres) y formando biofilm. Se eligieron para este estudio: 2 cepas *Leuconostoc mesenteroides* (J32, J57), 1 cepa *Lactobacillus plantarum* (J39) y 1 *Oenococcus oeni* (IS151) ya que fueron las que mostraron una mayor capacidad de formar biofilm según las pruebas realizadas anteriormente.

a) En primer lugar se calculó la concentración mínima inhibitoria de los agentes antimicrobianos: metabisulfito, etanol y nisina utilizando el método de microtiter utilizando placas de 96 pocillos siguiendo el método descrito por Rojo-Bezares y col. (2007) y que se indica en el apartado 4.2.1. para BA y BL. Se define como CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) la mínima concentración de agente antimicrobiano que se necesita para inhibir el crecimiento de la cepa bacteriana a la mitad después de una incubación de 72 horas tanto para *O. oeni* como para BA y 48 horas para el resto de BL. Para ello se utilizó el medio MRS-líquido (pH=3,5) y se realizaron diluciones dobles seriadas de los agentes antimicrobianos metabisulfito, etanol y nisina. Partiendo de dos disoluciones stock de nisina diferentes de 800 µg/ml y de 2,3 g/l (Nisin from *Streptococcus lactis*, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) en HCl 0,02N. Las concentraciones de nisina estudiadas se encontraban en el rango de 0,097 a 575 mg/l (diluciones dobles seriadas). Las concentraciones de metabisulfito potásico (Winy, Sepsa-Enartis, San Martino, Trecate, Italia) ensayadas fueron desde 0,073 a 150 µg/ml. Las concentraciones de etanol (etanol absoluto, Panreac Química, S.A.) testadas fueron desde 0,007 a 15 % (v/v) en agua destilada estéril. Se partió de una suspensión celular con D.O._{660nm} de 0,4 para *O. oeni*, 0,2 para el resto de BL y para las BA estudiadas. El crecimiento se midió mediante absorbancia a 655 nm (Bio-Rad microtiter reader, modelo 680, Bio-Rad, Hercules, California) y se emplearon dos controles: uno para el control de crecimiento de la cepa correspondiente y otro sin inocular con la cepa como control de contaminaciones.

b) Para el estudio de la tolerancia al etanol de las BL en forma planctónica se realizó una suspensión celular de D.O._{660nm} = 0,4-0,5 (medido en cubeta de 1 mm de ancho) a partir de un cultivo fresco de la cepa correspondiente, y se tomaron 20 µl para inocular 60 ml de medio de cultivo líquido cuya composición era MRS y 0, 2, 4, 6, 8 y 12% (v/v) etanol. Las cepas se incubaron a 23°C durante 48 horas bajo agitación continua a 100 rpm (incubador Innova 4330, New Brunswick Scientific, Paris, Francia). La población bacteriana se determinó mediante recuentos de UFC/ml según el método descrito en el apartado 1.3.

3.6. Formación de biofilms de bacterias lácticas en presencia de etanol y de nisina

Se estudió la capacidad de formar biofilm de las bacterias cuando en el medio existe una concentración de etanol. Las cepas se incubaron en medio BHI-líquido con diferentes concentraciones de etanol: 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 % (v/v) y se realizó el análisis del biofilm según se describe en el apartado 3.2. De forma paralela también se analizaron las poblaciones de bacterias viables tanto de las células que forman el biofilm y quedan adheridas a la pared del tubo, como de las células que quedan en el sobrenadante (en estado planctónico) mediante el análisis de UFC/ml según se describe en el apartado 1.3.

También se ensayó la combinación del etanol y la nisina en el medio de cultivo y se estudió su efecto sobre la formación de biofilm. Se utilizó el medio BHI-líquido con etanol 0, 2, 4, 6 y 8 % (v/v) en combinación con nisina comercial en las concentraciones de 6 y 200 µg/ml con incubación de 48 horas a 25°C y sin agitación. La elección de estas concentraciones de nisina se realizó en base a los valores de CMI de la nisina calculados previamente, siendo la concentración de 6 µg/ml una concentración subinhibitoria, y la de 200 µg/ml cercana a la CMI. Se realizó por triplicado tanto la cuantificación del biofilm formado según se describe en el apartado 3.2. como la cuantificación de la población en forma planctónica (UFC/ml) mediante el método descrito en el apartado 1.3.

3.7. Tolerancia al etanol y a la nisina de biofilms de bacterias lácticas previamente formados

Se estudió la tolerancia de un biofilm formado en ausencia de etanol a la adición de etanol en el medio. Para ello se incubó la correspondiente cepa formadora de biofilm en medio BHI-líquido durante 48 horas y posteriormente el medio de cultivo con las células planctónicas fueron eliminadas por decantación, y se añadió sobre el biofilm formado medio BHI fresco con diferentes porcentajes de etanol (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 %). Después de 24 horas de incubación a 25°C y sin agitación, se cuantificó el biofilm según el método descrito en el apartado 3.2. De forma paralela también se midió la población (UFC/ml) presente en el biofilm y en forma planctónica según el método descrito en el apartado 1.3. Ambos ensayos se realizaron por triplicado.

De forma análoga, también se estudió la tolerancia del biofilm formado durante 48 horas en ausencia de los agentes antimicrobianos, a la adición de medio con etanol y nisina. Se empleó el medio líquido BHI con las concentraciones de etanol de 0, 2, 4, 6 y 8 % (v/v) en combinación con 0, 6 y 200 µg/ml de nisina. Se incubó cada cepa formadora de biofilm a 25°C en el medio BHI-

líquido durante 48 horas, al cabo de las cuales se eliminó por decantación el sobrenadante con las células planctónicas, y se añadió sobre el biofilm formado medio BHI fresco con las distintas combinaciones de etanol y nisina. Tras 24 horas de incubación a 25°C sin agitación del biofilm en el medio líquido con las distintas combinaciones de los dos antimicrobianos, se cuantificó el biofilm por triplicado según el método descrito en el apartado 3.2.

4. PRODUCCIÓN DE NISINA EN CONDICIONES ENOLÓGICAS Y EFECTO SOBRE LAS BACTERIAS

4.1. Cepas utilizadas para el estudio de la producción de nisina y sensibilidad a la nisina

Las 77 BL y 28 BA bacterias utilizadas en el estudio de la producción de nisina y de la sensibilidad a la nisina se muestran en la **Tabla II-4**. Las BL utilizadas en este estudio fueron 76 aisladas de muestras de vino y mosto de la D.O.Ca. Rioja y 1 de origen lácteo, y 25 de las 28 BA fueron aisladas de vino y vinagre. La cepa productora de nisina denominada *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LM29 y fue amablemente cedida por el grupo del Dr. Juan Miguel Rodríguez del Departamento de Nutrición y Bromatología, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y había sido aislada de leche materna.

Tabla II-4. Cepas de bacterias lácticas y acéticas utilizadas para el estudio de sensibilidad frente al extracto activo de nisina obtenido en este estudio.

BACTERIAS LÁCTICAS			
Especie	Nº cepas	Nombre de las cepas	Origen
<i>Lactococcus lactis</i>	1	LM29	Lácteo
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	4	C531, J27, J29, J40	Enológico (UR)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	1	C533	Enológico (UR)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	27	E14, E3, J23, J31, J36, J39, J51, J52, J53, J55, J56, J58, J59, J61, J62, J63, J65, J67, J69, J71, J73, J75, J77, J78, T20, T53, Y17	Enológico (UR)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	2	IS111, J83	Enológico (UR)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	3	J47, J48, J57	Enológico (UR)
<i>Lactobacillus brevis</i>	1	J54	Enológico (UR)
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	2	J80, J81	Enológico (UR)
<i>Pediococcus parvulus</i>	1	J82	Enológico (UR)
<i>Oenococcus oeni</i>	35	IS1, IS109, IS11, IS127, IS13, IS135, IS14, IS143, IS151, IS154, IS158, IS159, IS167, IS177, IS18, IS186, IS189, IS196, IS209, IS21, IS24, IS27, IS40, IS41, IS43, IS45, IS46, IS48, IS51, IS53, IS59, IS83, IS92, IS95, IS97	Enológico (UR)

BACTERIAS ACÉTICAS			
Especie	Nº cepas	Nombre de las cepas	Origen
<i>Acetobacter aceti</i>	1	C656	CECT298
<i>Gluconobacter oxydans</i>	9	C657	CECT360
		I34, I38, I40, I7, IS219, IS262, IS283, V3	Enológico (UR)
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	7	C658	CECT474
		IS227, IS245, IS286	Enológico (UR)
		R28, R30, R90	Vinagre (UR)
<i>Acetobacter orleanensis</i>	6	IS242, IS259, IS282, IS291, IS293, IS294	Enológico (UR)
<i>Gluconacetobacter europaeus</i>	2	R1, R48	Vinagre (UR)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	3	R35, R36, R41, R46	Vinagre (UR)

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

UR: Colección de la Universidad de La Rioja

4.2. Métodos para la determinación de la actividad antimicrobiana

Se determinó la actividad antimicrobiana de distintas muestras y extractos de nisina mediante las técnicas de microtiter y difusión en agar (Rojo-Bezares *et al.*, 2007). Se utilizó la cepa *Pediococcus pentosaceus* C531 sensible a la nisina como cepa control e indicadora de la actividad.

4.2.1. Técnica de microtiter

El ensayo se realizaba en placas microtiter de 96 pocillos (Costar, Corning, NY, USA) con 50 µl del medio MRS 2X (concentrado al doble), 25 µl del extracto activo de nisina y 25 µl de la cepa bacteriana cuya sensibilidad se iba a determinar. Se realizaban diluciones dobles seriadas del extracto activo o muestra de nisina, y en cada ensayo se llevaban controles de crecimiento de la bacteria en el medio únicamente con MRS-líquido, así como una muestra control "blanco" sin cepa bacteriana. Las células de la bacteria se suspendían en solución salina estéril y su absorbancia a 660 nm se ajustaba entre 0,2-0,5. Las placas microtiter se incubaban a 30°C en anaerobiosis en estufa con un 5 % de CO₂ para BL y en aerobiosis cuando se ensayan BA. Se realizaron medidas de absorbancia a 655 nm a las 48-72 horas para *O. oeni*, a las 24-48 horas para el resto de BL y 48-72 horas para BA en un lector de placas microtiter (Bio-Rad microtiter reader, modelo 680). Al cabo de las horas establecidas en cada caso (24-72 h) se realizaba la medición de la D.O._{655nm} comprobando que el pocillo control de crecimiento alcanzaba una absorbancia alrededor de 1, para así poder asegurar el correcto crecimiento de la bacteria estudiada. La actividad

antimicrobiana expresó en unidades de actividad (U.A.), definiendo U.A. como el máximo factor de dilución de la muestra que inhibe al menos al 50 % el crecimiento de la cepa bacteriana. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

4.2.2. Técnica de difusión en agar

La técnica de difusión en agar se realizó en placas del medio TSA (40 g/l) (Trypticasa Soja Agar, Becton-Dickson) suplementado con 5 g/l de extracto de levadura (Scharlau Chemie) denominado TSAYE sobre las que se colocaba un molde formador de pocillos. Seguidamente se preparaba una suspensión bacteriana de escala 1 McFarland en 3 ml de solución salina estéril de la cepa indicadora *P. pentosaceus* C531, utilizando 80 µl de esta suspensión bacteriana para inocular tubos con 10 ml de BHI semisólido [preparado con BHI líquido (Becton-Dickson) suplementado con 0,75 % de agar] previamente atemperados a 55°C. Tras adicionar la suspensión de la bacteria indicadora sobre las placas de TSAYE y con el molde colocado, se dejaba enfriar la capa de BHI semisólido y se desmontaba el molde. Por último se rellenaban los pocillos con 50 µl de extracto activo a testar y se incubaron a 30°C durante 24 horas en anaerobiosis. La aparición de un halo de inhibición del crecimiento de la bacteria alrededor del pocillo era indicativo de la actividad antimicrobiana de la nisina.

4.3. Estudio de la producción de nisina por la cepa *L. lactis* LM29

La cepa productora de nisina, *L. lactis* LM29 se cultivó en el medio MRS-líquido, y se partió de un cultivo fresco de 24 horas en placa de MRS-agar en condiciones de anaerobiosis (9-13 % CO₂) a 30°C. Se recogieron las células del cultivo fresco y se realizó una suspensión celular en MRS-líquido hasta alcanzar una D.O._{660nm} de 0,5. Se tomaron 1,5 ml de dicha suspensión y se inoculó un matraz con 30 ml de MRS-líquido (pH=3,5), alcanzándose una población inicial cercana a 10⁷ UFC/ml. También se llevó un control negativo con MRS sin inocular. Se incubaron a 22°C, con agitación constante de 100 rpm (incubador Innova 4330) durante 48 horas.

Se monitorizó el crecimiento de la cepa *L. lactis* LM29 mediante la medida de la absorbancia a 660 nm y recuentos en placas de MRS-agar para determinar la población de bacterias viables (UFC/ml). También se tomaron alícuotas de 1 ml del medio de cultivo a los tiempos de 3, 6, 8, 9, 25, 29, 33 y 48 horas de incubación para determinar la actividad antimicrobiana; estos ensayos se realizaron por triplicado. Con el fin de eliminar la presencia de posibles células de la bacteria productora en las alícuotas de 1 ml, éstas se sometieron a 100°C

durante 15 minutos en baño de agua y se centrifugaron a 14.800 x g durante 5 minutos (Biofuge Heraeus, Thermo Scientific, Willmington, USA) desechando el precipitado de células y recogiendo el sobrenadante en un tubo limpio. Este era el extracto libre de células que se utilizó posteriormente para determinar su actividad antimicrobiana.

A continuación se estudió la producción de nisina por la cepa *L. lactis* LM29 en las siguientes condiciones: diferentes concentraciones de mosto de uva blanca (marca Casón Histórico, Mercadona, España) esterilizado por filtración a través de 0,22 μm), de etanol, y la combinación de ambos simulando condiciones enológicas.

4.3.1. Estudio del crecimiento de *L. lactis* LM29 y su producción de nisina en MRS con mosto de uva blanca

El objetivo de este ensayo fue estudiar el efecto que produce la presencia de mosto de uva blanca en el medio de cultivo sobre el crecimiento de la cepa LM29 y su producción de nisina. Para realizar este experimento se utilizó el mosto de uva blanca indicado, y se ensayaron los medios de cultivo con la siguiente composición: MRS (pH=3,5) con 0, 20, 40, 60 y 80 % de mosto, y 100 % mosto. A partir de un cultivo fresco en placa de la cepa *L. lactis* LM29 en MRS-agar durante 24 horas a 30°C en anaerobiosis, se realizó una suspensión celular de $\text{D.O.}_{660\text{nm}} = 1$ en solución salina. Se tomaron alícuotas de 100 μl de esta suspensión y se inocularon 3 ml de cada uno de los seis medios preparados, obteniéndose una población inicial de la cepa productora *L. lactis* LM29 de aproximadamente 10^5 - 10^7 UFC/ml. Paralelamente se prepararon las muestras controles negativos con las mismas composiciones de los medios, pero sin inoculación de la cepa LM29. Todas las muestras se incubaron a 30°C durante 24 horas sin agitación. Se tomaron alícuotas para la monitorización del crecimiento por absorbancia y UFC/ml a tiempo inicial y a las 12 y 24 horas de incubación de la cepa LM29, y para actividad bacteriocina se tomaron alícuotas a las 12 y 24 h. Los ensayos se realizaron por triplicado. Las muestras para la determinación de la actividad bacteriocina por microtiter y difusión en agar fueron hervidas y después centrifugadas como se describe anteriormente para obtener el extracto libre de células.

4.3.2. Estudio del crecimiento de *L. lactis* LM29 y su producción de nisina en MRS con etanol

Para estudiar el efecto del etanol tanto sobre el crecimiento como sobre la producción de nisina de *L. lactis* LM29 se realizaron dos tipos de experimentos.

a) En primer lugar se utilizó el medio MRS (pH=3,5) con diferentes concentraciones de etanol (0, 2, 6, 8, 10 y 12 % v/v) utilizando etanol absoluto (Panreac Química S. A.) e incubándose a 20°C. Se realizó este ensayo de igual manera que el descrito en el apartado 4.3.1.

b) Posteriormente se estudió la tolerancia al etanol y la producción de nisina de *L. lactis* LM29, pero en este caso partiendo de una población inicial de la bacteria LM29 productora menor. Se partió de un cultivo fresco de la cepa *L. lactis* LM29 de 24 horas en MRS-agar y anaerobiosis y a partir de este cultivo se preparó una suspensión celular homogénea de D.O._{660nm} = 0,4-0,5 (medido en una cubeta de 1 mm de ancho) en MRS-líquido. Se tomaron alícuotas de 20 µl de esta suspensión para inocular 60 ml de los distintos medios. Los medios contenían MRS-líquido (pH=3,5) con diferentes concentraciones de etanol absoluto (Panreac Química, S.A.): 0, 2, 4, 6, 8 y 12 %. Se incubaron las muestras con agitación continua a 100 rpm a 20°C durante 48 h. También se llevaron controles negativos sin inocular. Se tomaron muestras en diferentes tiempos de incubación (0, 6,5, 23, 31 y 47 horas) para la monitorización del crecimiento (medición de D.O._{660nm} y UFC/ml) y también se tomaron alícuotas para ensayar la actividad bacteriocina por las técnicas de microtiter y difusión en agar. Todos estos ensayos se realizaron por triplicado.

4.3.3. Estudio del crecimiento de *L. lactis* LM29 y su producción de nisina en MRS con mosto y etanol

El siguiente paso fue estudiar el efecto de la combinación de mosto y etanol sobre el crecimiento y producción de nisina de la cepa LM29. Para ello se utilizaron los medios: A) MRS, B) MRS + 60 % mosto, C) MRS + 60 % mosto + 8% etanol y D) MRS + 60 % mosto + 12 % etanol. La concentración de MRS-líquido (pH=3,5) fue en todos los casos la cantidad sólida (52 g/l) recomendada por el fabricante y disuelta en la mezcla de mosto, etanol y agua en la cantidad adecuada.

Se partió de un cultivo fresco de la cepa *L. lactis* LM29 en MRS-agar 24h en anaerobiosis. Se preparó una suspensión de D.O._{660nm} = 0,5 y se tomaron alícuotas de 1 ml de esta suspensión para inocular 20 ml de cada uno de los medios descritos (A, B, C y D). Los cultivos fueron incubados durante 48 horas a 22°C con agitación constante de 100 rpm. También se llevaron controles

negativos sin inóculo de bacteria. Se realizaron por triplicado mediciones del crecimiento y se obtuvieron extractos para la medición de la actividad bacteriocina a tiempo inicial y a las 24, 48 y 120 horas de incubación.

4.3.4. Obtención de un extracto activo de nisina de grado enológico

El objetivo de los cultivos que a continuación se describen fue el obtener un extracto activo con nisina y con unas características en su composición que pudieran ser utilizadas en el ámbito enológico. Para ello se utilizó el medio MRS-líquido con un 60 % del mosto de uva blanca comercial y 12 % de etanol. Además se pretendía obtener una cantidad considerable de extracto (45 ml) y poder utilizarlo posteriormente para testar su actividad frente a bacterias de origen enológico (bacterias lácticas y acéticas) y estudiar la inhibición del crecimiento bacteriano debida a la presencia de nisina en el extracto.

Se preparó un medio que contenía 52 g/l de MRS a pH=3,5, 60% (v/v) del mosto estéril, 12 % de etanol y agua. Se preparó una suspensión celular a partir de un cultivo de 24 h a 30°C y anaerobiosis de LM29 en solución salina de $D.O_{660nm} = 1$ y se utilizaron alícuotas de 300 μ l de esta suspensión para inocular 15 muestras de 3 ml cada una con el medio MRS + 60 % mosto + 12 % etanol preparado. Paralelamente se prepararon 5 muestras como controles negativos del medio sin inocular. Todas las muestras se incubaron a 23°C durante 24 horas en jarra de anaerobiosis (9-13 % CO₂). Se controló el crecimiento y actividad bacteriocina de 6 muestras. A las 24 horas de incubación se recogieron los 3 ml de medio de cultivo de cada uno de las 15 muestras en dos tubos de ensayo estériles de 50 ml y en otro diferente los controles negativos. Las muestras fueron hervidas y centrifugadas como se describe anteriormente para eliminar células y restos sólidos que pudieran quedar. Estos extractos libres de células se guardaron congelados a -20°C para posteriormente analizar su actividad bacteriocina mediante las técnicas de microtiter y difusión en agar frente a la cepa indicadora *P. pentosaceus* C531.

Posteriormente se utilizó este extracto y los controles negativos del medio sin inocular, para testar su efecto inhibitor del crecimiento de las bacterias de origen enológico de la **Tabla II-4** utilizando la técnica de microtiter. Los resultados se expresaron en U.A. de 50 μ l de extracto, es decir, el máximo factor de dilución de la muestra capaz de inhibir al menos a la mitad el crecimiento de una determinada cepa bacteriana. Para estos ensayos se utilizó como control positivo una disolución de 2,5 mg/l de nisina comercial (Nisin of *Streptococcus lactis*, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Esta disolución patrón se utilizó para poder determinar la concentración aproximada en nisina en el extracto.

5. METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS DE *Lactococcus lactis* EN PRESENCIA DE ETANOL EN EL MEDIO DE CULTIVO

El objetivo de estos ensayos fue estudiar el metabolismo de aminoácidos de la cepa productora de nisina *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 y tres de sus mutantes cuando crecen en un medio que contiene etanol, prestando una especial atención a la ruta ADI y a la posible generación de aminos biógenas. Para ello se partió del cultivo de dichas cepas en diferentes medios que con/sin arginina y con/sin etanol y se analizó el perfil aminoacídico, las aminos biógenas y el ión amonio presentes a tiempo inicial y en la fase estacionaria de crecimiento de estas BL.

5.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas en este estudio fueron: *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 y tres de sus mutantes denominados: MG Δ argR (defectivo en el gen argR) con ruta ADI y síntesis de Arg activas; MG Δ ahrC (defectivo en el gen ahrC), y el doble mutante MG Δ argR Δ ahrC ambos con la ruta ADI inactiva y con la síntesis de arginina activa (Larsen *et al.*, 2004). Estas cepas fueron amablemente cedidas por el grupo de investigación del Dr. Oscar Kuipers de la Universidad de Groeningen (Holanda). Las características de estas cepas se detallan en la **Tabla II-5**.

Tabla II-5. Cepas utilizadas en el estudio metabólico de *L. lactis* MG1363.

Nombre de la cepa	Descripción	Características
MG1363	<i>Lactococcus lactis</i>	Wild type
MG Δ argR	<i>L. lactis</i> mutante defectivo en el gen argR	Ruta ADI activa Biosíntesis Arg no reprimida
MG Δ ahrC	<i>L. lactis</i> mutante defectivo en el gen ahrC	Ruta ADI no activa Biosíntesis Arg no reprimida
MG Δ argR Δ ahrC	<i>L. lactis</i> doble mutante	Ruta ADI no activa Biosíntesis Arg no reprimida

El cultivo de las cepas se realizó en el medio mínimo químicamente definido (CDM) indicado en el apartado 1.2. basado en el descrito previamente por Larsen y col. (2004). Se ensayaron diferentes condiciones de cultivo con las siguientes variaciones en la composición del medio CDM: presencia de 2,5 mg/ml o ausencia (0 mg/l) de arginina (Merck, Darmstadt, Alemania)

y presencia de 2 % (v/v) o ausencia (0 %) de etanol (Panreac, Barcelona, España) en el medio de cultivo. Fueron en total 4 condiciones de cultivo para cada cepa bacteriana: a) CDM con 2,5 mg/ml de arginina y sin etanol; b) CDM sin arginina y sin etanol; c) CDM con 2,5 mg/ml de arginina y 2 % de etanol; d) CDM sin arginina y con 2 % de etanol.

La cepa *L. lactis* MG1363 denominada “wild type” y sus tres mutantes fueron incubados a 30°C y sin agitación. Se midió la densidad óptica a 660 nm usando un espectrofotómetro (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, Cambridge, UK) para determinar sus respectivas curvas de crecimiento. Las muestras se tomaron en el momento inicial de la inoculación (tiempo 0) y después de 10 horas de incubación, correspondiente a la fase estacionaria de crecimiento con cada uno de los 4 tratamientos ensayados. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Estas muestras fueron guardadas congeladas a -80°C hasta su análisis por HPLC.

También se realizó la incubación de la cepa MG1363 (wild type) en el medio CDM descrito en el apartado 1.2. anterior adicionando en este caso 290 mg/l de histidina (Merck, Darmstadt, Alemania) y con 2,5 mg/ml de arginina y 0 y 2 % etanol hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento (10 horas) a 30°C. Las muestras fueron guardadas congeladas a -80°C hasta su análisis por HPLC.

5.2. Análisis por HPLC de aminoácidos, aminas biógenas y del ión amonio

Se analizaron los aminoácidos, el ion amonio y las aminas biógenas presentes en las muestras libres de células tomadas a tiempo inicial y en fase estacionaria para las 4 cepas en los 4 medios de cultivo descritos. Se realizó el análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa, previa derivatización de los compuestos aminados con el agente dietil etoximetilen-malonato (DEEMM) siguiendo el método previamente descrito por [Gómez-Alonso y col. 2007](#).

Los analitos se identificaron en base al tiempo de retención de la aminoenona derivada de la reacción de derivatización de los correspondientes patrones y se cuantificaron usando el método de patrón interno con L-2-ácido aminoadípico.

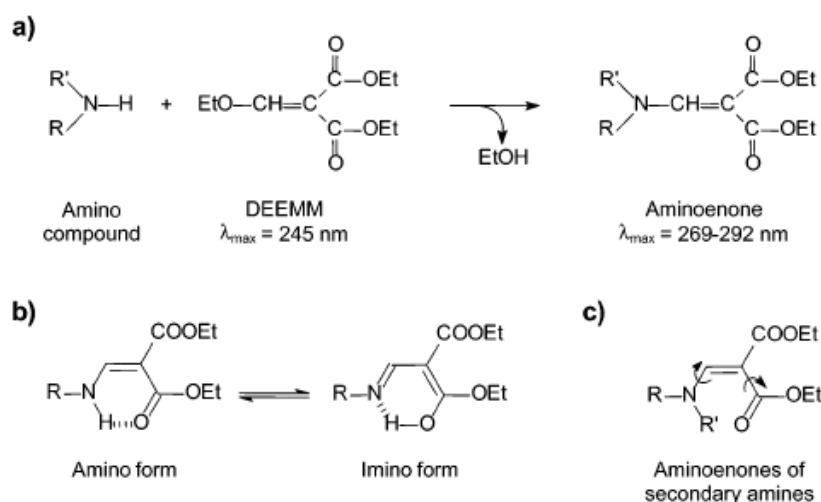


Figura II-1: Estructura de las aminoenonas derivadas de aminoácidos en: (a) reacción de derivatización; (b) derivado primario del aminoácido; y (c) derivado secundario del aminoácido.

La reacción de derivatización se realizó en tubos de 15 ml con: 1,75 ml de buffer borato 1M (pH 9), 750 μl de metanol (Panreac, Barcelona, España), 1 ml de muestra, 20 μl de patrón interno L-2-ácido aminoadípico 1 g/l (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y 30 μl DEEMM (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania). Los tubos de reacción se mantuvieron en un baño de ultrasonidos (Sonorex Digital 10P, Sigma-Aldrich) durante 30 minutos para homogeneizar la mezcla de reacción. Después los tubos se calentaron en un baño a 70°C durante dos horas para finalizar la reacción de derivatización y conseguir la completa degradación del exceso de DEEMM. Las muestras se filtraron (Syringe Filters polipropileno, 0,2 μm , 25 mm, OlimPeak, Teknokroma) antes de ser inyectadas en el sistema de HPLC.

Los análisis se realizaron en un módulo de cromatografía líquida Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con una bomba cuaternaria G1311A, un desgasificador en línea G1379A, un horno de columna G1316A, un inyector automático G1313A y un detector de fotodiodo (DAD) G1315B controlado por el software Chemstation Agilent. La separación cromatográfica se realizó en una columna ACE HPLC (5 C18-HL) con un tamaño de partícula de 5 mm (250 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno) con una precolumna del mismo material (ACE Integral Guard Cartridge).

En la separación mediante HPLC se empleó una mezcla binaria compuesta por la fase A acuosa (tampón acetato 25 mM, pH=5,85 con 0,02 % de azida de sodio) y la fase B orgánica (80:20 acetonitrilo:metanol). El caudal de la fase móvil fue de 0,9 ml/min y el gradiente se describe en la siguiente **Tabla II-6**.

Tabla II-6. Gradiente de los eluyentes para la determinación por HPLC de las aminoácidos derivadas de aminoácidos, aminas biógenas e ión amonio.

Tiempo (min)	0,0	20,0	30,5	33,5	65,0	73,0	78,0	82,0	85,0
Fase A (%)	90	90	83	83	60	28	18	0	0
Fase B (%)	10	10	17	17	40	72	82	100	100

Se analizaron los cromatogramas a 280 nm para la identificación e integración de los picos correspondientes a cada aminoácido, amina biógena o ión amonio, realizando previamente las correspondientes rectas de calibrado a partir de patrones comerciales.

Este método descrito por [Gomez-Alonso y col. \(2007\)](#) permite la detección de 24 aminoácidos y 9 aminas biógenas, por ello además de los patrones de los aminoácidos presentes en el medio CDM se emplearon los patrones adicionales para la identificación de los picos en los cromatogramas: L-aspartico, 5-OH-triptófano, L-histidina (Merck, Darmstadt, Alemania), ácido glutámico, L-glutamina (Panreac, Barcelona España), OH-prolina (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Alemania), L-citrulina (Merck), sulfato de agmatina y GABA (Sigma-Aldrich). Y para las aminas biógenas: putrescina e histamina (Sigma-Aldrich).

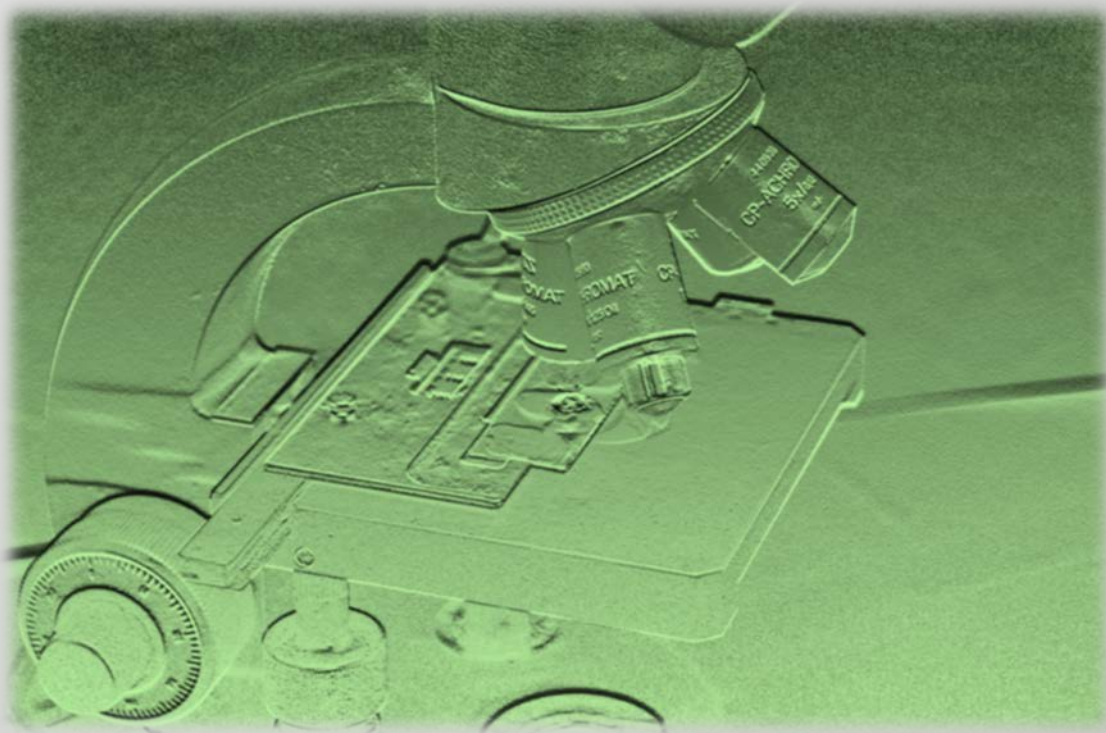
Los patrones utilizados para cuantificar los aminoácidos fueron: L-arginina, L-asparagina, L-alanina, L-isoleucina, L-lisina monohidrato, L-ornitina y L-treonina (Merck, Darmstadt, Alemania), glicina, L-leucina, L-metionina, L-fenilalanina y L-serina (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Alemania), L-valina (Sigma-Aldrich), cloruro de amonio (Panreac, Barcelona España). El patrón utilizado para las aminas biógenas fue: espermidina (Sigma-Aldrich).

Se identificaron los picos según su tiempo de retención con el correspondiente aminoácido/amonio/amina biógena.

Tras la elaboración de las rectas de calibrado con los patrones, se interpolaron los resultados obtenidos para las muestras analizadas provenientes del cultivo de *Lactococcus lactis* MG1363 y sus mutantes para así determinar las concentraciones de aminoácidos, amonio y aminas biógenas en las muestras.

5.3. Análisis estadístico de los resultados

Con el fin de poder comparar los valores de concentración obtenidos con los 4 tratamientos probados para las 4 cepas analizadas, se realizó el tratamiento estadístico de los datos. Los datos obtenidos por triplicado para las muestras tomadas a tiempo inicial y en fase estacionaria se analizaron utilizando el programa IBM SPSS Statistics 19 para Windows mediante análisis de la varianza (ANOVA). Se realizó el análisis ANOVA y se utilizó el índice de Tukey en el análisis post-hoc y $p < 0,05$ empleando el programa IBM SPSS Statistics 19 para Windows. Mediante este análisis se pudo determinar si existían diferencias significativas o no entre los resultados para un mismo aminoácido (comparando la concentración inicial y los valores en la fase estacionaria para los 4 tratamientos).



Resultados y Discusión

Results & Discussion

1. CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA Y CLONAL DE BACTERIAS ACÉTICAS DEL VINAGRE

1.1. Cultivo de las muestras de vinagres elaborados por el método sumergido

De todos los medios sólidos de cultivo ensayados (GY- agar, GY-agar con CaCO₃, manitol-agar y MRS agar) para el aislamiento de las BA de las muestras tomadas de los tanques en plena fermentación acética sumergida, el más adecuado resultó ser el medio GY agar que contiene 5 % de glucosa, 1 % de extracto de levadura y 1,5 % de agar. Este medio ya había sido descrito por otros autores como óptimo para el crecimiento de BA y como el que permite recuperar la mayoría de las especies de vinagres elaborados por el método tradicional (Gullo *et al.*, 2006). Los ensayos realizados adicionando etanol y ácido acético al medio GY agar no mejoraron la tasa de crecimiento de los aislados (datos no mostrados). Además las BA crecieron mejor sin los inhibidores nistatina (inhibidor de levaduras) ni penicilina (inhibidor de bacterias lácticas) en el medio, ya que la presencia de estos compuestos provocó una disminución notable en el crecimiento de las BA (datos no mostrados). Tampoco observamos el halo esperado en el medio GY agar con CaCO₃ (carbonato cálcico insoluble que con el ácido acético producido por las BA se solubiliza) para ninguno de los aislados, como ya se había encontrado anteriormente ya que muchas BA pierden su capacidad de producir ácido acético al pasarlas a medio sólido (Sievers & Teuber 1995).

Estos resultados corroboraron la dificultad del cultivo en el laboratorio de BA, ya descrito por otros autores (Sokollek *et al.*, 1998, Torija *et al.*, 2010; Vegas *et al.*, 2010, 2013). En el caso de los vinagres de alcohol de nuestro estudio, la adaptación previa que realizamos en el medio líquido GY con agitación para favorecer el crecimiento de las BA en el posterior cultivo en placa Petri con GY agar, tuvo éxito y permitió el aislamiento y posterior identificación de los aislados de BA. Esta necesaria adaptación al medio de cultivo había sido descrita anteriormente para el crecimiento de BA (Millet & Lonvaud Funel 2000).

Cabe señalar en este punto referente al cultivo de BA, que un trabajo publicado por Vegas *y col.* (2013) sobre BA de vinagre de vino elaborado mediante el método tradicional, las especies de BA identificadas utilizando métodos basados en la PCR tras el cultivo en placa fueron las mismas que las identificadas por métodos cultivo-independientes. Por lo tanto los aislados de BA obtenidos en nuestro estudio podemos considerarlos representativos de la microbiota

mayoritaria presente en los vinagres en plena fermentación acética en los tanques de fermentación sumergida muestreados.

1.2. Observación de bacterias del vinagre al microscopio

De las 59 muestras de vinagres en plena fermentación recogidas en este estudio, se de BA que fueron identificados a nivel de especie y de cepa 90 aislados. Todos los aislados fueron Gram negativos y de forma elipsoidal a redondeada.

A continuación se muestran algunas fotografías (**Figuras III-1 y 2**) de las BA encontradas en los vinagres estudiados en las que se puede observar que los microorganismos mayoritarios en el vinagre son las BA aunque en algunos casos se observaron otros tipos de microorganismos como levaduras o bacterias lácticas en poblaciones minoritarias provenientes de la materia prima que era el vino.

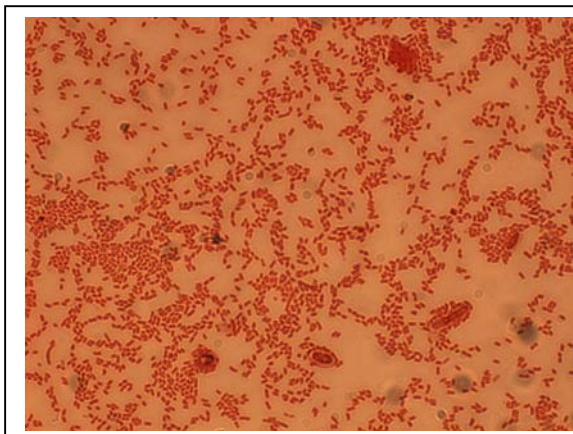


Figura III-1. Bacilos cortos Gram negativos (BA) y levaduras observados en el vinagre tras tinción Gram (630 aumentos)

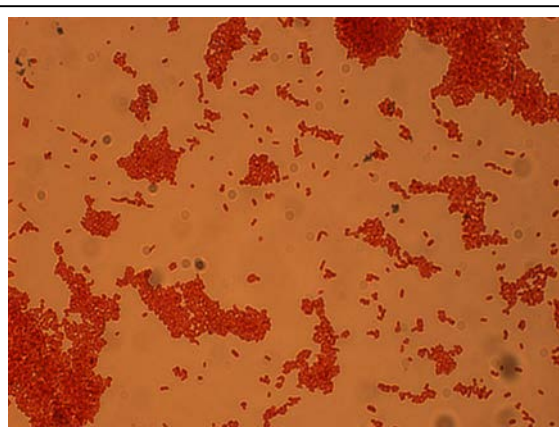


Figura III-2. Bacilos cortos Gram negativos (BA) observados en el vinagre tras tinción Gram (630 aumentos)

1.3. Recuento de células por microscopía de fluorescencia

La cuantificación de la población bacteriana mediante el método de recuento de las colonias que aparecen al cultivar la muestra con las diluciones adecuadas, en placa Petri con el medio GY agar resultó no ser adecuado, debido a que la mayoría de las BA crecían formando un biofilm de forma continua sobre la superficie de la placa Petri que impedía la formación de colonias y el posterior recuento, tal y como se ha indicado en el apartado 2.3. de Materiales y Métodos. Se ha descrito en la bibliografía la producción de exopolisacáridos por BA (Gullo & Giudici 2008), siendo los dextranos, levanos y celulosa los principales exopolisacáridos producidos

por el metabolismo de la glucosa de las BA. Esta característica de las BA favorece la formación de biofilms que dificultan la formación de colonias en la superficie del medio de cultivo sólido.

A la vista de lo cual se procedió a poner a punto el método de recuento de células mediante microscopía de fluorescencia, un método rápido de tinción con las sondas fluorescentes SYTO 9 y yoduro de propidio (LIVE/DEAD BacLight kit) que distinguen entre células viables y células dañadas en la muestra analizada, según se ha descrito en el apartado 2.4. de Materiales y Métodos. Este método resultó ser fiable y eficaz para el recuento de células totales, no-viables y viables, tal y como otros autores ya habían descrito (Mesa *et al.*, 2003; Baena-Ruano *et al.*, 2006). La **Figura III-3** muestra la relación ($r^2=0,90$) entre el conteo de células viables realizado por microscopía de fluorescencia en 21 muestras de vinagre y las correspondientes velocidades de fermentación en los bioreactores. En estas 21 muestras estudiadas se incluyeron muestras de los cuatro tipos de vinagre (vino blanco, vino tinto, sidra y etanol). La **Tabla III-1** muestra que las velocidades de fermentación más altas (0,33-0,34 grados acéticos/h) correspondían a las mayores poblaciones celulares ($7,5-9,5 \times 10^7$ células/ml), y las velocidades de fermentación más bajas (0,15 a 0,19 grados acéticos/h) correspondían a los rangos más bajos de recuentos de población ($2,8-3,8 \times 10^7$ células/ml).

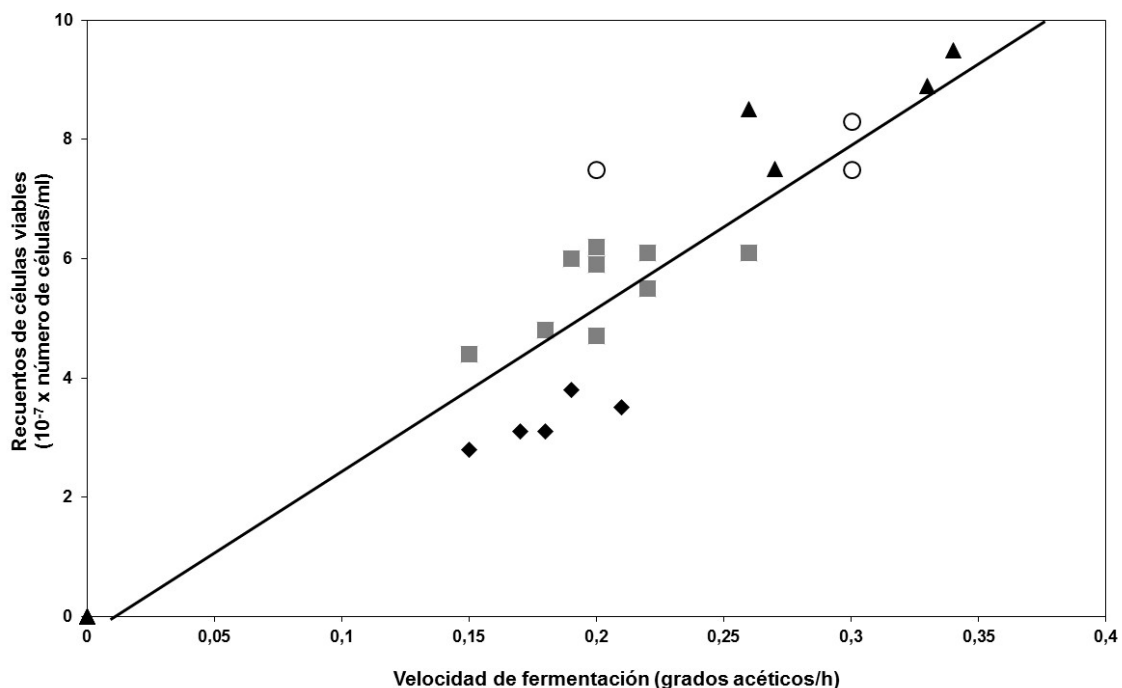


Figura III-3. Población de células viables y velocidades de fermentación de los vinagres estudiados.

■ Vinagre de vino blanco; ▲ Vinagre de sidra; ○ Vinagre de vino tinto; ◆ Vinagre de etanol

Según muestra la **Figura III-3**, en los vinagres de sidra aparecieron las mayores poblaciones ($9,5 \times 10^7$ bacterias viables/ml) que corresponde a una velocidad de fermentación de 0,34 grados acéticos/h. Y por otro lado, la menor población se encontró en vinagres de etanol ($2,8 \times 10^7$ bacterias viables/ml) que corresponde a una velocidad de 0,15 grados acéticos/h. Para los vinagres tanto de vino blanco como de vino tinto se encontraron valores de poblaciones y velocidades intermedios entre los encontrados para sidra y etanol. Los vinagres de vino tinto presentaron mayores velocidades al compararlos con los vinagres de vino blanco.

Tabla III-1. Recuentos de células viables mediante el método de microscopía de fluorescencia, y velocidad de fermentación en los vinagres estudiados

Tipo de vinagre	Velocidad de fermentación (grados acéticos/h)	Células viables/ml
Vinagre de etanol	0,15	$2,8 \times 10^7$
Vinagre de etanol	0,17	$3,1 \times 10^7$
Vinagre de etanol	0,21	$3,5 \times 10^7$
Vinagre de etanol	0,18	$3,1 \times 10^7$
Vinagre de etanol	0,19	$3,8 \times 10^7$
Vinagre de vino blanco	0,20	$4,7 \times 10^7$
Vinagre de vino blanco	0,22	$6,1 \times 10^7$
Vinagre de vino blanco	0,20	$6,2 \times 10^7$
Vinagre de vino blanco	0,15	$4,4 \times 10^7$
Vinagre de vino blanco	0,18	$4,8 \times 10^7$
Vinagre de vino blanco	0,22	$5,5 \times 10^7$
Vinagre de vino blanco	0,19	$6,0 \times 10^7$
Vinagre de vino blanco	0,26	$6,1 \times 10^7$
Vinagre de vino blanco	0,20	$5,9 \times 10^7$
Vinagre de vino tinto	0,30	$8,3 \times 10^7$
Vinagre de vino tinto	0,30	$7,5 \times 10^7$
Vinagre de vino tinto	0,20	$7,5 \times 10^7$
Vinagre de sidra	0,33	$8,9 \times 10^7$
Vinagre de sidra	0,26	$8,5 \times 10^7$
Vinagre de sidra	0,27	$7,5 \times 10^7$
Vinagre de sidra	0,34	$9,5 \times 10^7$

Baena-Ruano y col. (2006) también describieron una correlación entre los recuentos directos de BA y la formación de ácido acético en vinagres de vino elaborados por el método sumergido utilizando un biorreactor piloto semi-continuo (8 litros de volumen de trabajo) y en condiciones de laboratorio. En nuestro estudio, el resultado de que las poblaciones de células viables más altas se encuentren en los vinagres elaborados a partir de sidra, se podría explicar por el hecho de que ésta es rica en azúcares (4 %), tal como describen Del Campo y col. (2008), y posee

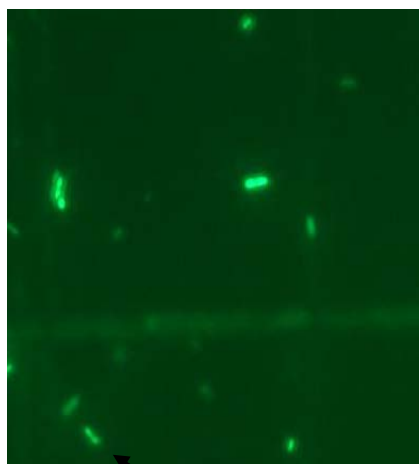
un bajo contenido en etanol (6 %). Las poblaciones más bajas se midieron en vinagres de etanol, que presentó las condiciones de crecimiento más estresantes para las bacterias (14 % etanol y nutricionalmente muy pobres) a pesar de que en la elaboración de este tipo de vinagre se realiza la adición de un suplemento de extracto de levadura (Acetozym DS plus, Frings, Alemania) al líquido a acetificar para facilitar su fermentación.

Este estudio es el primero en el que se describe la correlación entre células viables y velocidades de fermentación en biorreactores industriales que producen diferentes vinagres por el método sumergido. Cada punto en la **Figura III-3** representa un proceso de fermentación diferente a partir de un material de partida diferente (vino, sidra o etanol) y en las correspondientes condiciones de su biorreactor. En todos los casos el momento de la toma de muestra correspondió a la misma etapa de fermentación: plena fermentación acética bajo velocidad constante de fermentación (0,17-0,34 grados acéticos/h).

Las **Figuras III-4** y **5** muestran las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia para BA viables (**Figura III-4**) y BA no viables (**Figura III-5**). Los recuentos de células totales realizados con el microscopio en campo visible coincidían con la suma de células viables y no viables determinadas por fluorescencia (datos no mostrados). Los recuentos de BA mediante el método de tinción de fluorescencia se había descrito por [Mesa y col. \(2003\)](#), que aplicaban este método a cepas de referencia y a muestras de vinagres obtenidas directamente de biorreactores. Su método incluía un paso de filtrado a través de una membrana de policarbonato y observación al microscopio de fluorescencia, la etapa de filtración fue omitida en nuestro estudio debido a que no mejoraba la resolución de nuestro análisis y aumentaba la manipulación de la muestra.

El método de fluorescencia puesto a punto en este estudio permite cuantificar poblaciones que por el método de recuento en placa no se pueden analizar. Por otro lado cabe señalar que según [Vegas y col. \(2013\)](#) los recuentos de colonias en placa de BA aisladas de vinagres de vino elaborados por el método tradicional suelen proporcionar resultados más bajos que los recuentos al microscopio.

Si comparamos el método puesto a punto en este trabajo con la técnica de PCR cuantitativa aplicada al análisis de BA presentes en vinificaciones de vino tinto ([Andorrá et al., 2008](#)) el límite de detección por PCR cuantitativa es de 10^3 - 10^4 células/ml, mientras que nuestro método rápido de microscopía de fluorescencia es capaz de detectar hasta 10^2 células/ml en la muestra inicial.



Célula viable

Figura III-4. Fotografía de la imagen con fluorescencia de las células viables (teñidas con la sonda SYTO 9) de la muestra de vinagre A (aumentos X 400).



Célula no viable

Figura III-5. Fotografía de la imagen con fluorescencia de las células no viables (teñidas con la sonda yoduro de propidio) de la muestra de vinagre A (aumentos X 400).

Por lo tanto, el método descrito en este estudio podría ser considerado como el método óptimo de elección para el recuento de BA en muestras de vinagres obtenidas de biorreactores industriales para la elaboración de vinagres por el método sumergido provenientes de vino, sidra y etanol, y como alternativa al método de recuento en placa que no resulta adecuado para este tipo de muestras. Es un método rápido y preciso como para poder utilizarlo en un análisis de rutina en un laboratorio. Además mediante este método se determina tanto la población de bacterias viables como de las no viables, proporcionando unos resultados rápidos que permiten una inmediata actuación ante cualquier problema en las fermentaciones, y por tanto su solución.

1.4. Validación método de microscopía de fluorescencia con bacterias lácticas y en condiciones enológicas

Para poder validar el método rápido de recuento mediante fluorescencia en diferentes condiciones, se siguió la metodología descrita en el apartado 2.5. de Materiales y Métodos. Se aplicó dicho método de fluorescencia y el método clásico de recuento en placa para diferentes bacterias lácticas (*Lactobacillus plantarum* J51, *Leuconostoc mesenteroides* J32 y *Lactococcus lactis* LM29) en condiciones de laboratorio y para *Oenococcus oeni* en condiciones enológicas durante la FML en bodega. Se realizaron los recuentos mediante este método de fluorescencia (células viables/ml) en las condiciones descritas y se comparó con el recuento realizado mediante el método clásico de recuento en placa (UFC/ml) realizado de forma simultánea.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura III-6**, en la que se puede apreciar que la nube de puntos obtenida al realizar la representación del logaritmo decimal de los valores de recuentos obtenidos se ajusta a una ecuación de un polinomio de segundo grado.

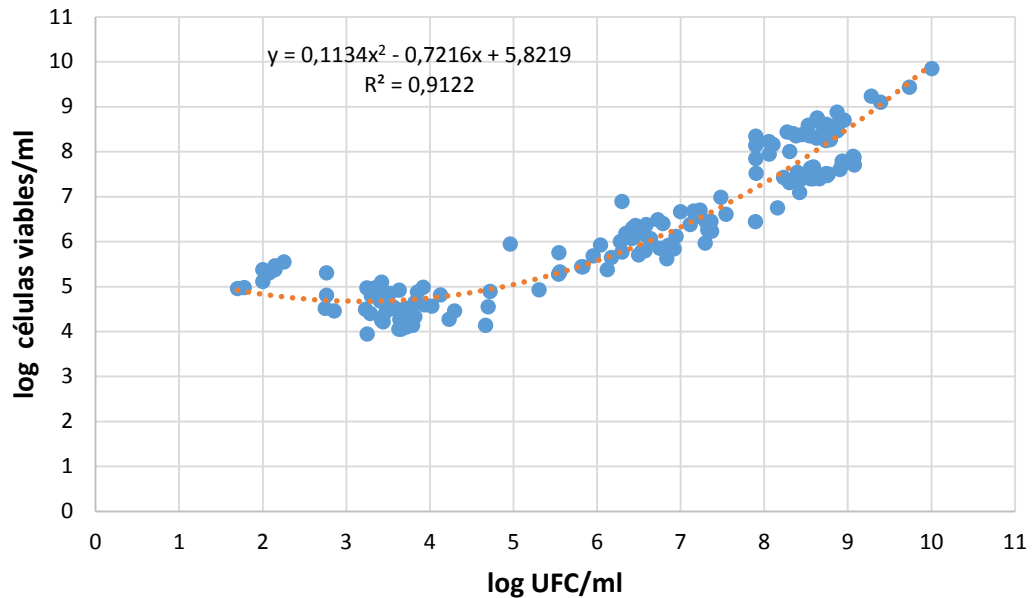


Figura III-6. Ajuste polinómico de segundo grado para la distribución de todos los puntos analizados en el análisis poblacional.

A la vista de la distribución de la nube de puntos, pudimos observar una relación lineal en la zona a partir de $\log \text{ UFC/ml} \geq 1000$. Se realizó el ajuste lineal de dicha zona (**Figura III-7**), comprobándose un buen ajuste lineal ($R^2 = 0,89$) dentro de la diversidad de condiciones en los análisis realizados.

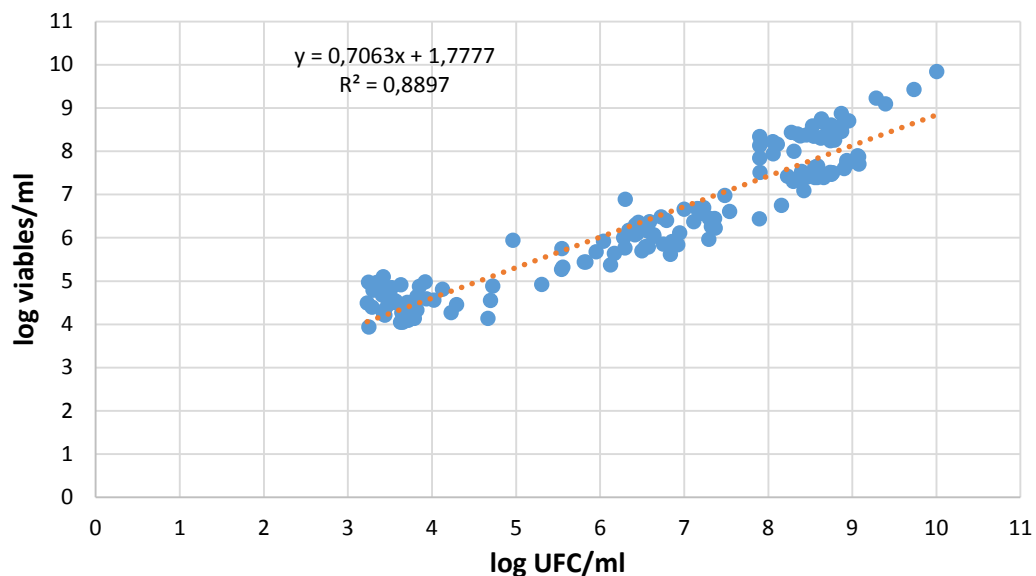


Figura III-7. Ajuste lineal para los análisis realizados con recuentos mayores o iguales a 1000 UFC/ml.

A continuación se muestran algunas de las fotos de microscopía de fluorescencia obtenidas en los ensayos con BL considerados para la validación del método (**Figura III-8**).

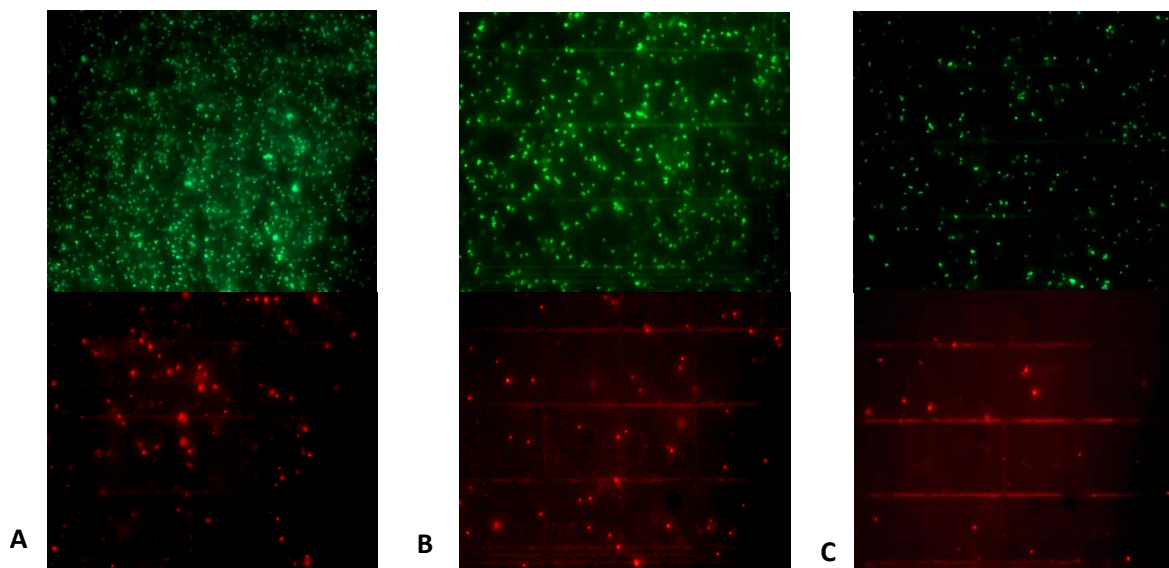


Figura III-8. Imágenes de microscopía de fluorescencia (400 aumentos) para las muestras de la cepa *L. mesenteroides* J32 con una incubación de 48 horas en MRS (A), MRS con 8 % etanol (B) y MRS con 12 % etanol (C).

Según los resultados mostrados, ambos métodos (el método rápido de recuento mediante fluorescencia y el método clásico de recuento en placa) se correlacionan linealmente ($y = 0,7063x + 1,7777$) cuando las poblaciones bacterianas son mayores de 10^3 UFC/ml, y por tanto, la cuantificación de células viables por el método de fluorescencia será el método recomendado de elección para la cuantificación de poblaciones de bacterias acéticas en plena fermentación acética, para la cuantificación rápida de células viables, y para la población de la población microbiana cuando el crecimiento en placa no permita el conteo de colonias por la formación de biofilms o por cualquier otra razón que impida el cultivo.

1.5. Identificación a nivel de especie de las bacterias acéticas aisladas

En primer lugar se determinó la concentración de DNA adecuada para obtener una banda de amplificación en el análisis por PCR descrito en la sección 2.6.1. de Materiales y Métodos. Los resultados indicaron que la concentración adecuada estaba entre 80-150 ng/ μ l, obteniéndose resultados negativos para concentraciones menores y mayores de DNA.

Se estudiaron 90 aislados provenientes de las muestras de vinagres mediante amplificación por PCR de la región intergénica 16S-23S del operón rRNA, secuenciación del amplicón obtenido y comparación con los datos de GenBank como se ha descrito en la sección 2.6.2. de Materiales y Métodos. Los resultados de esta identificación a nivel de especie se muestran en la **Tabla III-2**, resultando que todos los aislados obtenidos pertenecen a tres especies: *Gluconacetobacter europaeus*, *Ga. xylinus* y *Acetobacter pasteurianus*.

Tabla III-2. Nombre e identificación de especie de 90 aislados obtenidos de las muestras de vinagre estudiadas.

	<i>Ga. europaeus</i>	<i>A. pasteurianus</i>	<i>Ga. xylinus</i>
Vinagre de vino blanco	R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, R11, R12, R13, R14; R17, R18, R19, R20, R21, R22, R23, R24, R25, R26, R27; R29, R31, R32, R33; R42, R43, R44, R45; R51, R52, R53, R54, R55, R56, R57, R58, R59, R60, R61, R62, R63, R64, R65, R66, R67, R68, R69, R70; R73, R75; R80, R81, R83 (58)	R91 (1)	R50 (1)
Vinagre de vino tinto	R15, R68, R77, R82 (4)		R136, R138, R145, R151, R156 (5)
Vinagre de sidra	R39, R40, R48, R95, R96, R97 (6)	R28, R30, R90 (3)	R35, R36, R37, R38, R41, R46, R47, R49 (8)
Vinagre de etanol	R71, R72, R78, R79 (4)		

Entre paréntesis se indica el número total de cepas de la especie correspondiente.

Este método de amplificación de la región intergénica 16S-23S del operón rRNA y posterior secuenciación ha sido utilizado para la identificación de BA de vinagres de vino y alcohol (Trcek 2005), para identificar BA aisladas de vino (Ruiz *et al.*, 2000) o de BA de colección (González *et al.*, 2006a).

En la **Tabla III-3** se muestran los resultados de la identificación taxonómica de los aislados secuenciados en este estudio y los resultados de sus correspondientes alineamientos con las secuencias disponibles en GenBank utilizadas para su identificación.

Tabla III-3. Identificación de especie por PCR ITS 16S-23S, secuenciación y comparación con datos de GenBank (Blast-N) de aislados de BA de los vinagres estudiados.

Aislado	Secuencia de GenBank alineada (Blast-N)	Nº acceso GenBank	E value	Max. Identidad	Identificación
R1	<i>Ga. europaeus</i> strain L13	AM049396.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R3	<i>Ga. europaeus</i> LMG 18494 clone 2	KC478464.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R5	<i>Ga. europaeus</i> strain L13	AM049396.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R6	<i>Ga. europaeus</i> LMG 18494 clone 2	KC478464.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R14	<i>Ga. europaeus</i> LMG 18494	KC478464.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R21	<i>Ga. europaeus</i> strain L13	AM049396.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R24	<i>Ga. europaeus</i> DNA for 16S-23S spacer region	X85406.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R26	<i>Ga. europaeus</i> LMG 18494 clone 1	KC478457.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R27	<i>Ga. europaeus</i> LMG 18494 clone 2	KC478464.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R31	<i>Ga. europaeus</i> strain 1P1	FJ715627.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R32	<i>Ga. europaeus</i> strain 1P1	FJ715627.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R33	<i>Ga. europaeus</i> strain 1P1	FJ715627.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R36	<i>Ga. xylinus</i> genes for 16S rRNA, 16S-23S rRNA ITS, 23S rRNA, partial and complete sequence	AB161453.1	0.0	98%	<i>Ga. xylinus</i>
R37	<i>Ga. xylinum</i> EAG3 strain	X85726.1	0.0	97%	<i>Ga. xylinus</i>
R38	<i>Ga. xylinus</i> genes for 16S rRNA, 16S-23S rRNA ITS, 23S rRNA, partial and complete sequence	AB161453.1	0.0	98%	<i>Ga. xylinus</i>
R39	<i>A. europaeus</i> DNA for 16S-23S spacer region	X85406.1	0.0	92%	<i>Ga. europaeus</i>
R41	<i>Ga. xylinus</i> genes for 16S rRNA, 16S-23S rRNA ITS, 23S rRNA, partial and complete sequence	AB161453.1	0.0	98%	<i>Ga. xylinus</i>
R47	<i>A. xylinum</i> EAG3 strain	X85726.1	0.0	96%	<i>Ga. xylinus</i>
R48	<i>Ga. europaeus</i> LMG 18494 clone 2	KC478464.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R49	<i>A. xylinum</i> EAG3 strain	X85726.1	0.0	94%	<i>Ga. xylinus</i>
R51	<i>Ga. europaeus</i> LMG 18494 clone 2	KC478464.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R55	<i>Ga. europaeus</i> LMG 18494 clone 2	KC478464.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R57	<i>Ga. europaeus</i> LMG 18494 clone 2	KC478464.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R59	<i>Ga. europaeus</i> LMG 18494 clone 2	KC478464.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R62	<i>Ga. europaeus</i> strain 1P1	FJ715627.1	0.0	97%	<i>Ga. europaeus</i>
R67	<i>Ga. europaeus</i> LMG 18494 clone 2	KC478464.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R68	<i>Ga. europaeus</i> LMG 18494 clone 2	KC478464.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R69	<i>Ga. europaeus</i> strain 1P1	FJ715627.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R70	<i>Ga. europaeus</i> LMG 18494 clone 2	KC478464.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R80	<i>Ga. europaeus</i> LMG 18494 clone 2	KC478464.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R83	<i>Ga. europaeus</i> LMG 18494 clone 2	KC478464.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R90	<i>A. pasteurianus</i> strain L15	AM049398.1	0.0	97%	<i>A. pasteurianus</i>
R95	<i>Ga. europaeus</i> strain DSM 13109	HE802685.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R96	<i>Ga. europaeus</i> strain DSM 13109	HE802685.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>
R97	<i>Ga. europaeus</i> strain DSM 13109	HE802685.1	0.0	99%	<i>Ga. europaeus</i>

Aislado	Secuencia de GenBank alineada (Blast-N)	Nº acceso GenBank	E value	Max. Identidad	Identificación
R137	<i>A. xylinum</i> EAG3 strain	X85726.1	0.0	98%	<i>Ga. xylinus</i>
R138	<i>A. xylinum</i> EAG3 strain	X85726.1	0.0	98%	<i>Ga. xylinus</i>
R145	<i>A. xylinum</i> EAG3 strain	X85726.1	0.0	98%	<i>Ga. xylinus</i>
R151	<i>A. xylinum</i> EAG3 strain	X85726.1	0.0	98%	<i>Ga. xylinus</i>
R156	<i>A. xylinum</i> EAG3 strain	X85726.1	0.0	98%	<i>Ga. xylinus</i>

*E value: probabilidad de que el alineamiento de la secuencia introducida con la secuencia de la base de datos se haya realizado por casualidad. Cuanto más bajo sea este valor, más significativo es el resultado.

*Max. Ident.: porcentaje de identidad que posee la secuencia introducida con la secuencia de la base de datos.

A continuación (**Figuras III-9 a 11**) se muestran a modo de ejemplo los alineamientos de las secuencias de los aislados R1, R3, R48, R55, R36 y R90, pertenecientes a las diferentes especies encontradas en este estudio, con las secuencias del banco de datos GenBank que presentan la máxima similitud en el análisis mediante el programa Blast-N.

R1 -----
 R48 -TCAAGCCACCAGCCAGATAAACCAGCCGGCAGATCGAGCAACAACACCCGCACAGAGAAA
 Ga. -TCAAGCCACCAGCCAGATAAACCAGCCGGCAGATCGAGCAACAACACCCGCACAGAGAAA
 R55 CTAAGCCACCAGCCAGATAAACCAGCCGGCAGATCGAGCAACAACACCCGCACAGAGAAA
 R3 -----CACCAGCCAGATAAACCAGCCGGCAGATCGAGCAACAACACCCGCACAGAGAAA

R1 -----AATTCAAACTTAACTCGTTCATGAACGCATGCGCCTTCATCAC
 R48 GTGCAGTGCATCGCACAATTCAAACTTAACTCGTTCATGAACGCATGCGCCTTCATCAC
 Ga. GTGCAGTGCATCGCACAATTCAAACTTAACTCGTTCATGAACGCATGCGCCTTCATCAC
 R55 GTGCAGTGCATCGCACAATTCAAACTTAACTCGTTCATGAACGCATGCGCCTTCATCAC
 R3 GTGCAGTGCATCGCACAATTCAAACTTAACTCGTTCATGAACGCATGCGCCTTCATCAC
 ***** * ****

R1 TTAGCATGGATACTCCGACTGCTCGGACCATCCACGGGTCAAACCAACCCGTGACAAAGG
 R48 CTAGCATGGATACTCCGACTGCTCGGACCATCCACGGGTGAGACCAACCCGTGACAAAGG
 Ga. TTAGCATGGATACTCCGACTGCTCGGACCATCCACGGGTGAGACCAACCCGTGACAAAGG
 R55 TTAGCATGGATACTCCGACTGCTCGGACCATCCACGGGTGAGACCAACCCGTGACAAAGG
 R3 TTAGCATGGATACTCCGACTGCTCGGACCATCCACGGGTGAGACCAACCCGTGACAAAGG
 ***** *****

R1 CACGTCCACGAACGCACCAACCTATTCACATTATCAAAGAGCAAACCTACCAGACCGCAA
 R48 CACGTCCACGAACGCACCAACCTATTCACATTATCAAAGAGCAAACCTACCAGACCGCAA
 Ga. CACGTCCACGAACGCACCAACCTATTCACATTATCAAAGAGCAAACCTACCAGACCGCAA
 R55 CACGTCCACGAACGCACCAACCTATTCACATTATCAAAGAGCAAACCTACCAGACCGCAA
 R3 CACGTCCACGAACGCACCAACCTATTCACATTATCAAAGAGCAAACCTACCAGACCGCAA

R1 CACCCCGTGCACCGCCAACGCGGTTCCACAAGGCATCCGTCCGATCTCCATTATCTTCCG
 R48 CACCCCGTGCACCGCCAACGCGGTTCCACAAGGCATCCGTCCGATCTCCATTATCTTCCG
 Ga. CACCCCGTGCACCGCCAACGCGGTTCCACAAGGCATCCGTCCGATCTCCATTATCTTCCG
 R55 CACCCCGTGCACCGCCAACGCGGTTCCACAAGGCATCCGTCCGATCTCCATTATCTTCCG
 R3 CACCCCGTGCACCGCCAACGCGGTTCCACAAGGCATCCGTCCGATCTCCATTATCTTCCG

R1 GCGACAATCTTTCCAGTCCAGCGCTTCAGCCCATGGGGCTTCCAGCCATTCCCTACCCTC
 R48 GCGACAATCTTTCCAGTCCAGCGCTTCAGCCCATGGGGCTTCCAGCCATTCCCTACCCTC
 Ga. GCGACAATCTTTCCAGTCCAGCGCTTCAGCCCATGGGGCTTCCAGCCATTCCCTACCCTC
 R55 GCGACAATCTTTCCAGTCCAGCGCTTCAGCCCATGGGGCTTCCAGCCATTCCCTACCCTC
 R3 GCGACAATCTTTCCAGTCCAGCGCTTCAGCCCATGGGGCTTCCAGCCATTCCCTACCCTC

R1 TCGACACCAGTCATTGGTGGAGGCGGACGGGATCGAACCAGACGACCCCTGCTTGCAAAG
 R48 TCGACACCAGTCATTGGTGGAGGCGGACGGGATCGAACCAGACGACCCCTGCTTGCAAAG
 Ga. TCGACACCAGTCATTGGTGGAGGCGGACGGGATCGAACCAGACGACCCCTGCTTGCAAAG
 R55 TCGACACCAGTCATTGGTGGAGGCGGACGGGATCGAACCAGACGACCCCTGCTTGCAAAG
 R3 TCGACACCAGTCATTGGTGGAGGCGGACGGGATCGAACCAGACGACCCCTGCTTGCAAAG

R1 CAGGTGCTCTCCAGCTGAGCTACGCCCCATCAGTGCATGCCATCACACGCACGCAGCA
 R48 CAGGTGCTCTCCAGCTGAGCTACGCCCCATCAGTGCATGCCATCACAGGCACGCAGCA
 Ga. CAGGTGCTCTCCAGCTGAGCTACGCCCCATCAGTGCATGCCATCACAGGCACGCAGCA
 R55 CAGGTGCTCTCCAGCTGAGCTACGCCCCATCAGTGCATGCCATCACACGCACGCAGCA
 R3 CAGGTGCTCTCCAGCTGAGCTACGCCCCATCAGTGCATGCCATCACACGCACGCAGCA

```

R1      GAACTGGTGGGCCAGGGAGGACTTGAACCTCCGACCCCACGCTTATCAAGCGTGTGCTCT
R48     GAACTGGTGGGCCAGGGAGGACTTGAACCTCCGACCCCACGCTTATCAAGCGTGTGCTCT
Ga .    GAACTGGTGGGCCAGGGAGGACTTGAACCTCCGACCCCACGCTTATCAAGCGTGTGCTCT
R55     GAACTGGTGGGCCAGGGAGGACTTGAACCTCCGACCCCACGCTTATCAAGCGTGTGCTCT
R3      GAACTGGTGGGCCAGGGAGGACTTGAACCTCCGACCCCACGCTTATCAAGCGTGTGCTCT

*****

R1      AACCAACTGAGCTACTAGCCCCAAAAGGGTCCATTGATTGTCGCTGGAAGGGATATGTTG
R48     AACCAACTGAGCTACTAGCCCCAAAAGGGTCCATTGATTGTCGCTGGAAGGGATATGTTG
Ga .    AACCAACTGAGCTACTAGCCCCAAAAGGGTCCATTGATTGTCGCTGGAAGGGATATGTTG
R55     AACCAACTGAGCTACTAGCCCCAAAAGGGTCCATTGATTGTCGCTGGAAGGGATATGTTG
R3      AACCAACTGAGCTACTAGCCCCAAAAGGGTCCATTGATTGTCGCTGGAAGGGATATGTTG
*****

R1      ACGGCGCGTTACACCGAAGTGCAGGCAGCCTACCTAGCTGTGCCTTGCCCGATCCTGCAG
R48     ACGGCGCGTTACACCGAAGTGCAGGCAGCCTACCTGGCTGTGCCTTGCCCGATCCTGCAG
Ga .    ACGGCGCGTTACACCGAAGTGCAGGCAGCCTACCTGGCTGTGCCTTGCCCGATCCTGCAG
R55     ACGGCGCGTTACACCGAAGTGCAGGCAGCCTACCTAGCTGTGCCTTGCCCGATCCTGCAG
R3      ACGGCGCGTTACACCGAAGTGCAGGCAGCCTACCTAGCTGTGCCTTGCCCGATCCTGCAG
*****

R1      GCAAGGACTTTATATAAGAAGCGTTC AAAACAGTCCAGTTACCCAGACCATCCTCAGAA
R48     GCAAGGACTTCATGTAAGAAGCGTTC AAAACAGTCCGGTTACCCAGA-----
Ga .    GCAAGGACTTTATATAAGAAGCGTTC AAAACAGTCCCGTTACCCAGA-----
R55     GCAAGGACTTTATATAAGAAGCGTTC AAAACAGTCCAGTTACCCAGA-----
R3      GCAAGGACTTTATATAAGAAGCGTTC AAAACAGTCCAGTTACCCA-----
***** ** ***** ** *****

```

Figura III-9. Alineamiento de las secuencias de los aislados R1, R3, R48 y R55 con la cepa *Ga. europaeus* L18494 con número de acceso de secuencia [KC478464.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/KC478464.1) en el GenBank. Los asteriscos representan coincidencia de nucleótidos.

```

R36      ACAGTCCCACATAAGAAAGTGCAGTTCATCTCACGACCACTCTTCTCTACTTCGTCGT
Ga.      ACAGTCCCACATAAGAAAGTGCAGTTCATCTCACGACCACTCTTCTCTACTTCGTCGT
*****

R36      CCATGTACGCTTTTCGCCACATCGCACAGCAGCAATACCCCGTTCCCCGGACCATCGCA
Ga.      CCATGTACGCTTCCGCCACATCGCACAGCAGCAATACCCCGTTCCCCGGACCATCGCA
*****

R36      TGGGTCAGACCAACCCGCGACACGGCACGCACACGAACGCACCAACCTATTCACACTGAC
Ga.      TGGGTCAGACCAACCCGCGACACGGCACGCACACGAACGCACCAACCTATTCACACTGAC
*****

R36      AAAGAACAACCTCACCAGACAAAGACACCCGGCGCCGCATCGCGGCTGCCGGACATCCGT
Ga.      AAAGAACAACCTCACCAGACTAAGACACCCGGCGCCGCATCGCGGCTGCCGGACATCCGT
*****

R36      CCGATCTCTTTTCCAACCAACAACCGTCTTCGTTCCAGACCCACAGCCTTCCGGCATCA
Ga.      CCGATCTCTTTTCCAACCAACAACCGTCTTCGTTCCAGACCCACAGCCTTCCGGCATCA
*****

R36      GGCAACCCAAACACAGGAATGGGCCACCTGGTGGAGGCGGACGGGATCGAACCGACGACC
Ga.      GGCAACCCAAACACAGGAATGGGCCACCTGGTGGAGGCGGACGGGATCGAACCGACGACC
*****

R36      CCCTGCTTGCAAAGCAGGTGCTCTCCAGCTGAGCTACGCCCCCGATGGTGATCCCGATG
Ga.      CCCTGCTTGCAAAGCAGGTGCTCTCCAGCTGAGCTACGCCCCCGATGGTGATCCCGATG
*****

R36      GTGGGCCAGGGAGGACTTGAACCTCCGACCCACGCTTATCAAGCGTGTGCTCTAACCAA
Ga.      GTGGGCCAGGGAGGACTTGAACCTCCGACCCACGCTTATCAAGCGTGTGCTCTAACCAA
*****

R36      CTGAGCTACTAGCCCAAAGGGTCCGACGATTGTTGCTGGACGGGATATGTTGACGGCGC
Ga.      CTGAGCTACTAGCCCAAAGGGTCCGACGATTGTTGCTGGACGGGATATGTTGACGGCGC
*****

R36      TTCCATGACA-AGGTCACGGGAATGCGGTTCTTGGCTGTGCCTCCCCTGATCCTAGAGG
Ga.      TTCCATGACCGAGGTCACGGGAATGCGGTTCTTGGCTGTGCCTCCCCTGATCCTAGAGG
*****

R36      GAGGACTTTTTATCGGAGCGTTCGAATCCGAACCGGTGCCCGTCCGAAGCT--
Ga.      GAGGACTTTTTACCGGAGCGTTCGAATCCGAACCGATTACCCGGTCCGAAGCT
*****

```

Figura III-10. Alineamiento de las secuencias del aislado R36 con *Ga. xylinus* con número de acceso de secuencia [AB161453.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/AB161453.1) en el GenBank. Los asteriscos representan coincidencia de nucleótidos.

```

A.pasteurianus -----ATTGTTTACTGATTGATTGGAATGTTCTGAATAAAAAG
R90 TTAGCCCATCTTCTGACTATTGCGTTTACTGATTGATTGGAATGTTCTGAATAAAAAG
      * *****

A.pasteurianus TCCTTTGCTTATGGATCGGCAAAGGCGCTGTCTGTCAGTTTCTGATGTGTTTGTGCATCG
R90 TCCTTTGCTTATGGATCGGCAAAGGCGCTGTCTGTCAGTTTCTGATGTGTTTGTGCATCG
      *****

A.pasteurianus GGGGCGCCGTCAACATATCCCTTCTGCAACAGATGTCTGAGTGATTTGGGCTGATACGT
R90 GGGGCGCCGTCAACATATCCCTTCTGCAACAGATGTCTGAGTGATTTGGGCTGATACGT
      *****

A.pasteurianus TTTTATGATTGTCTAGGTTATTCAGTCGGGTTTTGGGCTAGTAGCTCAGTTGGTTAGAG
R90 TTTTATGATTGTCTAGGTTATTCAGTCGGGTTTTGGGCTAGTAGCTCAGTTGGTTAGAG
      ***** **

A.pasteurianus CACACGCTTGATAAAGCGTGGGGTCGGAGGTTCAAGTCCTCCCTGGCCACCACCATTGA
R90 CACACGCTTGATAAAGCGTGGGGTCGGAGGTTCAAGTCCTCCCTGGCCACCACCATTGA
      *****

A.pasteurianus GACTGCCGTTTCTATGGGGGCGTAGCTCAGCTGGGAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGG
R90 GACTGCCGTTTCTATGGGGGCGTAGCTCAGCTGGGATACCACCTGCTTTGCAAGCAGGG
      ***** * *****

A.pasteurianus GGTCGTCGGTTCGAACCCGTCGGTCTCCACCAAGGATCTAGAGTGGTTTTGTGGTGTGA
R90 GGTCGTCGGTTCGAACCCGTCGGTCTCCACCAAGGATCTAGAGTGGTTTTGTGGTGTGA
      *****

A.pasteurianus GAGTATCTGTTGCAAGGGAGTTTGTGGATCGGACTTCATTTATGCGGCGCTGCGATAGCG
R90 GAGTATCTGTTGCAAGGGA-TTTGTGGATCGGACTTCATTTATGCGGCGCTGCGATAGCG
      *****

A.pasteurianus GCACGTATGGGTGTATGTCTGGTGTGATCTTTGTGAGTGTGAATCGGTTGGTGCGCGTC
R90 GCACGTATGGGTGTATGTCTGGTGTGATCTTTGTCAATGGGAATCGGTTGGTGCGCGTC
      ***** * *****

A.pasteurianus TGGGCGTATCAGAAATGTGGGTTGGTCTGACCCGATTGAGCAAAGAGATTTGCTCATGC
R90 TGGGCGTATCAGAAATGTGGGTTGGTCTGACCCGATTGAGCACAGAGATTTGCTCATGC
      ***** * *****

A.pasteurianus GTTAAGCATTCTGGTGTAAAGCGTTTGAAGAGTACTCGGATG
R90 CTTAGCCATTCTGGTGTAAAGCGTTTGAAGAGTACTCGGATG
      *** *****

A.pasteurianus CGTCATGCTTTGGAGCTGTTTGTATCTGCGTAAGTAGGTATGGATGGTTTCTGTGCATGG
R90 CGTCATGCTTTGCACCTGTTTGTATCTGCTTAACTAGGTATGGATGGTTTCTGTGCATGG
      ***** * *****

A.pasteurianus GGTGA-----
R90 TGTGATCGAGAAAGGCCCTTCGGCCGGTGTGGGCAATGAGCGCGATAAGGGCCATTCGG
      ***

A.pasteurianus -
R90 G
    
```

Figura III-11. Alineamiento de las secuencias del aislado R90 con la cepa *A. pasteurianus* L15 con número de acceso de secuencia [AM049398.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/AM049398.1) en el GenBank. Los asteriscos representan coincidencia de nucleótidos.

Los resultados de la identificación taxonómica de los 90 aislados de este estudio se muestran en la **Figura III-12**. Como puede observarse, *Ga. europaeus* fue la especie cultivable predominante, apareciendo en el 87 % de los aislados y siendo predominante en vinagres de vino blanco y de etanol, es decir *Ga. europaeus* fue la especie que dirigía la fermentación de estos vinagres de vino blanco y de etanol. Esta especie fue descrita por primera vez en vinagres elaborados por el método sumergido en 1992 (Sievers *et al.*, 1992) y se ha caracterizado por su alta tolerancia al etanol (Trcek *et al.*, 2007). Cabe señalar aquí que actualmente cepas de la especie *Ga. europaeus* poseen gran interés biotecnológico por su capacidad de producir aminoácidos de cadena larga (valina, leucina e isoleucina) los cuales parece que pueden proporcionar características funcionales a los alimentos (reducción de la obesidad y la hiperglucemia) (Akasaka *et al.*, 2014).

Schüller y col. (2000) estudiaron también fermentaciones en cultivo sumergido de vinagre de etanol, sin embargo, ellos describieron la especie *Ga. entanii* en sus vinagres de alcohol. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio sobre *Ga. europaeus* como la especie de BA responsable de la fermentación sumergida en vinagres de etanol.

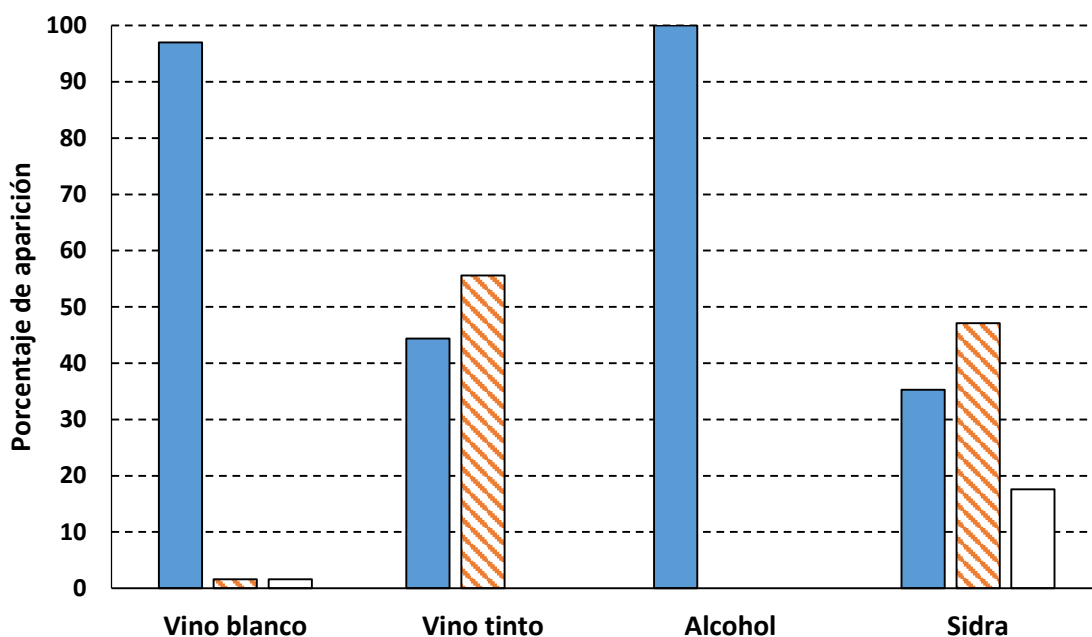


Figura III-12. Porcentaje de aparición de especies en los cuatro tipos de vinagre estudiados.
■ *Ga. europaeus*, ▨ *Ga. xylinus*, y □ *A. pasteurianus*

Los vinagres de sidra de nuestro estudio presentaron la mayor variabilidad de especies, encontrándose las especies *Ga. europaeus*, *Ga. xylinus* y *A. pasteurianus* entre sus aislados y apareciendo en un 35,3 %, 47,1 % y 17,6 % de los aislados respectivamente. Hasta donde conocemos éste es el primer estudio sobre las especies *Ga. xylinus* y *A. pasteurianus* como responsables de las fermentaciones de vinagres de sidra. Anteriormente se describieron en vinagres de sidra especies como *A. aceti*, *A. obodiens* y *A. pomorum* (Trcek 2005; Sokollek et al., 1998) y *Ga. intermedius* (Boesch et al., 1998). La especie *Ga. europaeus* se ha descrito para vinagres elaborados por el método sumergido (Sievers et al., 1992) y a partir de sidra (Boesch et al., 1998; Trcek et al., 2000). *Ga. xylinus*, *A. pasteurianus* y *Ga. europaeus* aparecían en vinagres balsámicos elaborados por el método tradicional (Gullo et al., 2006; Gullo, & Giudici 2008). *A. pasteurianus* también había sido descrito en vinagres de arroz (Haruta et al., 2006; Nanda et al., 2001); es la principal especie responsable de la elaboración de vinagres de vino, y la que se aísla de forma mayoritaria en vinos estropeados (Bartowsky et al., 2003, Bartowsky & Henschel 2008). En los vinagres elaborados mediante el método tradicional con una acetificación lenta aparece la especie *A. pasteurianus* al principio conduciendo la acetificación (Ilabaca et al., 2008; Vegas et al., 2010) y después aparecen las especies del género *Gluconacetobacter* (*Ga. europaeus* y *Ga. intermedius*) cuando las concentraciones de ácido acético son elevadas (Gullo et al., 2009; Hidalgo et al., 2010; Vegas et al., 2010). Nuestros resultados muestran que *Ga. xylinus* (47,1 % de los aislados) era la principal especie y la que dirigió las fermentaciones sumergidas de los vinagres de sidra.

Para los vinagres de vino tinto de nuestro estudio, los aislados de BA pertenecieron sólo a dos especies: *Ga. xylinus* (55,6 % de los aislados) y *Ga. europaeus* (44,4 %). Este resultado está de acuerdo con estudios sobre vino tinto que también demostraban la presencia de estas dos especies durante la fermentación alcohólica (González et al., 2004) y su aparición en vinagres de vino tinto elaborados tanto por el método superficial como por el sumergido (Callejón et al., 2008). Otros estudios sobre fermentaciones alcohólicas de vino tinto describen la presencia de *Ga. hansanii* (González et al., 2004, 2005; Andorrá et al., 2008), *G. oxydans*, *Ga. liquefaciens* (González et al., 2005) y *A. pasteurianus* (Bartowsky & Henschel 2008), sin embargo, estas especies no aparecieron en nuestras muestras de vinagre de vinos tintos. En nuestro estudio, la especie *A. pasteurianus* sólo apareció en apenas un 1,6 % de los aislados de vinagres de vino blanco y en vinagres de sidra en un 17,6 %, siendo en todos los casos la especie minoritaria frente a *Ga. europaeus* y *Ga. xylinus*.

En los vinagres de vino tinto y de sidra de nuestro estudio *Ga. xylinus* fue la especie predominante, esta especie había sido anteriormente descrita también como predominante en vinagres balsámicos (Gullo *et al.*, 2006; Gullo y Giudici 2008), en vinagres de arroz (Fu *et al.*, 2013) y también en vinagres de vino elaborados por el método superficial, aunque no como especie mayoritaria (Vegas *et al.*, 2010, 2013). *Ga. xylinus* se ha aislado en la "madre del vinagre" con la que se inicia la fermentación de vinagres de vino elaborados por el método tradicional (Vegas *et al.*, 2010, 2013) y la capacidad de esta especie para formar biofilms es una característica que le favorece para realizar e imponerse en la fermentación acética por el método tradicional.

Cabe señalar por otro lado, que la especie *Ga. xylinus* ha sido descrita como una especie productora de celulosa, con el consecuente interés industrial que ello encierra. Sin embargo, no todas las cepas de esta especie son capaces de producir celulosa y en GenBank se puede encontrar el genoma secuenciado completo de la cepa *G. xylinus* NBRC 3288 no productora de celulosa y aislada de un vinagre en Japón (Ogino *et al.*, 2011). Un paso importante en la elaboración del vinagre es la etapa de clarificación y filtración que permite la estabilización microbiológica y coloidal del producto final antes del embotellado. En esta etapa de filtración la presencia de partículas de celulosa en suspensión sería perjudicial para la filtrabilidad del producto. Hay que señalar, sin embargo, que en la vinagrería colaboradora de este estudio y que proporcionó todas las muestras, nunca se encontró ningún tipo de problema respecto a la filtrabilidad de sus vinagres, indicando con ello que sus bacterias *Ga. xylinus* no encerraban ninguna característica perjudicial en este sentido. Por lo tanto estas cepas de la especie *Ga. xylinus* también se podrían considerar como candidatos para cultivos seleccionados iniciadores de la acetificación en vinagres de vino tinto y sidra por el método sumergido.

Se han descrito en la bibliografía especies en vinagres elaborados por el método sumergido diferentes de las encontradas en nuestro estudio. *A. obodiens* y *A. pomorum* se describieron en vinagres de vino tinto y de sidra respectivamente (Sokollek *et al.*, 1998), *A. intermedius* en vinagres de sidra y etanol (Boesch *et al.*, 1998) y *A. malorum*, *A. cerevisiae* y *A. aceti* en vinagres de frutas (Hidalgo *et al.*, 2012; Hidalgo *et al.*, 2013). De forma similar *A. aceti* (Gullo *et al.*, 2006), *Ga. hansanii* y *A. malorum* (De Vero *et al.*, 2006) son especies descritas en vinagres balsámicos que no aparecieron en nuestras muestras de vinagres.

Nuestros resultados muestran que *Ga. europaeus* es la especie cultivable predominante que dirige la fermentación de vinagres de vino blanco, etanol (apareciendo en un 97 % y 100 % de los aislados respectivamente), y que también se encuentra en alta proporción en los vinagres de sidra (35,3 % de los aislados) y de vino tinto (44,4 % de los aislados). Por lo tanto, los resultados representados en la **Figura III-12** sugieren que cepas de *Ga. europaeus* pueden ser excelentes cultivos iniciadores para la elaboración de vinagres por el método sumergido. Otros estudios también describieron esta especie como una buena candidata para ser cultivo iniciador en vinagres balsámicos (Gullo *et al.*, 2006), tanto sola como en combinación con *A. pasteurianus* (Gullo *et al.*, 2009; Hidalgo *et al.*, 2010). Los cultivos mixtos se han utilizado para vinagres elaborados por el método tradicional, cuya fermentación es más lenta y permite la sucesión de especies (Mas *et al.*, 2014), sin embargo el método sumergido es muy rápido y es más difícil la imposición de diferentes especies por etapas. Por esta razón y a la vista de la alta predominancia de la especie *Ga. europaeus* en los vinagres de este estudio, y sobre todo en los vinagres de etanol que presentan las condiciones más extremas para el crecimiento de las BA, cepas de la especie *Ga. europaeus* constituirían excelentes cultivos seleccionados iniciadores de la fermentación acética de vinagres producidos por el método sumergido.

Cabe señalar aquí que Yamada y col. en 2012 propusieron que las especies *Ga. europaeus* y *Ga. xylinus* fueran renombradas como *Komagataeibacter europaeus* y *K. xylinus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=433>) y que en la literatura actualmente aparecen nombradas con ambas sinonimias.

1.6. Identificación de bacterias acéticas a nivel clonal mediante ERIC-PCR

Para la obtención del DNA total de las BA aisladas se ensayaron los protocolos indicados en la sección 2.7. de Materiales y Métodos, y el que permitió la amplificación del DNA y generar patrones de bandas consistentes en el posterior análisis de ERIC-PCR fue el método de extracción de DNA que incluía dos pasos: lisis rápida y eliminación de proteínas.

Mediante ERIC-PCR se analizaron 90 de los 157 aislados de BA, en la **Tabla III-4** y la **Figura III-13** se muestran los 31 patrones de bandas obtenidos para los 90 aislados de los diferentes tipos de vinagres, así como sus correspondientes especies. La **Tabla III-4** también muestra los patrones relacionados (Closely Related) (E3b relacionado con E3a y E5b relacionado con E5a) obtenidos para diferentes aislados de vinagre de vino blanco y tinto. El estudio de reproducibilidad se realizó analizando por duplicado 10 aislados, y el porcentaje de similitud en el análisis por duplicado de un mismo aislado fue del 81 % (porcentaje de similitud calculado mediante el método UPGMA empleando el coeficiente de Dice). Por lo tanto una similitud ≥ 81 % entre patrones de bandas de dos aislados indicaba que los aislados correspondían a la misma cepa bacteriana, y con una similitud < 81 % los aislados se consideraron de cepas diferentes.

El análisis de clúster utilizando el 81 % de similitud como valor de corte por debajo del cual se consideraban patrones distintos e inspección visual de las imágenes de ERIC-PCR generaron el dendrograma mostrado en la **Figura III-13**, que incluye un total de 31 patrones no relacionados para los 90 aislados de BA estudiados. Según se deduce del dendrograma, el porcentaje de similitud entre perfiles diferentes varía desde un 30 % a un 81 %. Los patrones se clasificaron en dos grupos con porcentajes de similitud mayores del 30 % (representado en la **Figura III-13** con una línea discontinua) dentro de cada grupo. Según este dendrograma mostrado en la **Figura III-13** con las imágenes del análisis de ERIC-PCR, los clúster generados no agrupan todos los aislados de vinagres del mismo origen ni los aislados de la misma especie.

Como se describió en el apartado 2.9. de Materiales y Métodos, se calculó el índice de diversidad a partir del número de patrones obtenidos en este análisis por ERIC-PCR, resultando un valor del 37 %. El coeficiente de correlación cofenética resultante en el análisis UPGMA fue mayor o igual al 68 %.

Tabla III-4. Patrones obtenidos por ERIC-PCR para 90 aislados de BA de vinagre.

Nombre del patrón	Patrones relacionados	Nº de aislados	Especie	Origen del vinagre
E1		7	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
E3a		13	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
	E3b	2	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
E5a		2	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
	E5b	3	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
E15		4	<i>Ga. europaeus</i>	Vino tinto
E18		3	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
E19		1	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
E27		1	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
E28		1	<i>A. pasteurianus</i>	Sidra
E30		1	<i>A. pasteurianus</i>	Sidra
E32		5	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
E36		2	<i>Ga. xylinus</i>	Sidra
E38		1	<i>Ga. xylinus</i>	Sidra
E39		2	<i>Ga. europaeus</i>	Sidra
E45		1	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
E46		2	<i>Ga. xylinus</i>	Sidra
E48		1	<i>Ga. europaeus</i>	Sidra
E49		2	<i>Ga. xylinus</i>	Sidra y vino blanco
E51		1	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
E52		2	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
E60		2	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
E61		5	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco y etanol
E62		4	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
E65		1	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
E81		2	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
E90		2	<i>A. pasteurianus</i>	Sidra
E109		9	<i>Ga. xylinus</i>	Sidra
E110		1	<i>Ga. xylinus</i>	Sidra
E111		2	<i>Ga. xylinus</i>	Sidra
E119		3	<i>Ga. xylinus</i>	Sidra
E125		1	<i>Ga. xylinus</i>	Sidra
E156		1	<i>Ga. xylinus</i>	Vino tinto
31 patrones	2 patrones relacionados	90 aislados		

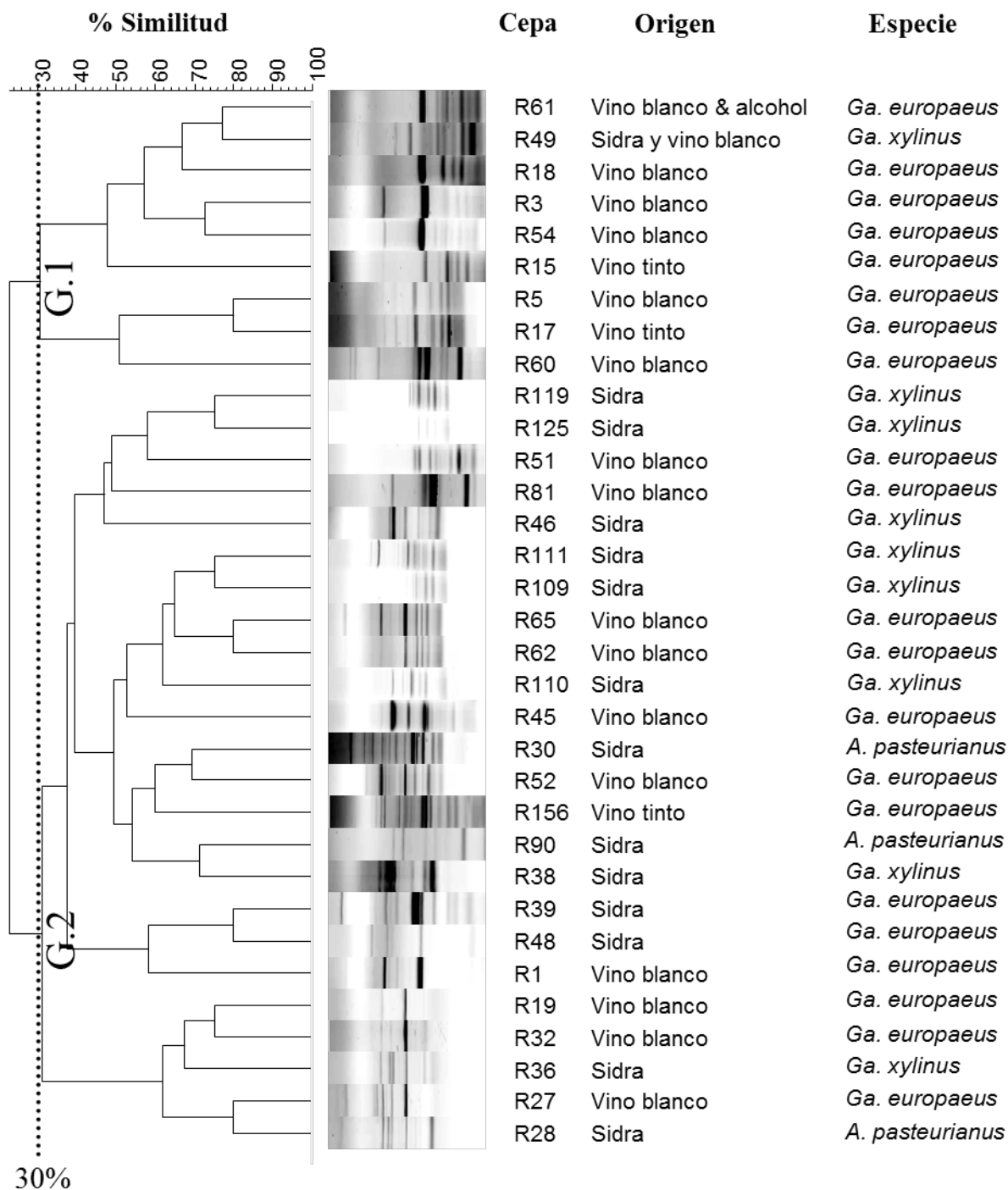


Figura III-13. Patrones de bandas obtenidos en el análisis por ERIC-PCR y dendrograma UPGMA generado para los 90 aislados de BA de vinagre.

En la **Tabla III-5** se muestran las cepas identificadas por el método de ERIC-PCR que aparecen en cada muestra de vinagre.

Tabla III-5. Cepas identificadas por el método de ERIC-PCR en las 37 muestras de vinagre estudiadas.

Muestra de vinagre	Materia prima del vinagre elaborado	Identificación especie	Nombre la cepa/s identificadas por ERIC-PCR
1	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	E1, E3
2	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	E5
3	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	E1, E5, E9
4	Vino tinto	<i>Ga. europaeus</i>	E15
5	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	E1, E18
6	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	E3, E19
7	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	E3
8	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	E27
9	Sidra	<i>A. pasteurianus</i>	E28
10	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	E1
11	Sidra	<i>A. pasteurianus</i>	E30
12	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	E3, E32
13	Sidra	<i>Ga. xylinus</i>	E36
14	Sidra	<i>Ga. xylinus</i>	E38
		<i>Ga. europaeus</i>	E39
15	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	E32, E45
16	Sidra	<i>Ga. xylinus</i>	E46, E49
		<i>Ga. europaeus</i>	E48
17	Vino blanco	<i>Ga. xylinus</i>	E49
		<i>Ga. europaeus</i>	E51, E52
18	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	E18
19	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	E60, E61
20	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	E62
21	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	E61, E62, E65
22	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	E65
23	Vino tinto	<i>Ga. europaeus</i>	E15
24	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	E62
25	Alcohol	<i>Ga. europaeus</i>	E61
26	Vino tinto	<i>Ga. europaeus</i>	E15
27	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	E81
28	Vino tinto	<i>Ga. europaeus</i>	E15
29	Sidra	<i>A. pasteurianus</i>	E90
30	Vino blanco	<i>A. pasteurianus</i>	E90
31	Sidra	<i>Ga. xylinus</i>	E109
32	Sidra	<i>Ga. xylinus</i>	E110, E111
33	Sidra	<i>Ga. xylinus</i>	E109
34	Sidra	<i>Ga. xylinus</i>	E119
35	Sidra	<i>Ga. xylinus</i>	E109, E125
36	Sidra	<i>Ga. xylinus</i>	E109
37	Vino tinto	<i>Ga. xylinus</i>	E156

Como se mencionó anteriormente, otros autores habían descrito el análisis por ERIC-PCR como un método adecuado para identificar a nivel de cepa aislados de BA (Nanda *et al.*, 2001; González *et al.*, 2005; Gullo *et al.*, 2009; Vegas *et al.*, 2010) y que sólo o en combinación con otro análisis (como pudiera ser (GTC)₅-rep-PCR) permitía descubrir una gran variabilidad genética en las BA (Valera *et al.*, 2011).

1.7. Plásmidos de *Ga. europaeus*

En la **Figura III-14** se muestra la imagen del gel de PFGE de los DNAs totales de 3 aislados pertenecientes a la especie *Ga. europaeus* (R59, R19 y R17) sin tratamientos de restricción. Se observa que aparecían además de la banda de DNA genómico, fragmentos de DNA entre 145-300 kb de posibles plásmidos bacterianos presentes en las BA, como ya describió Trcek y col. (2000).

En la base de datos GenBank están disponibles las secuencias de 8 plásmidos de la especie *Ga. xylinus*, sin embargo para *Ga. europaeus* no hay ningún plásmido secuenciado a pesar de que en GenBank están disponibles las secuencias completas del DNA total de las cepas *Ga. europaeus* LMG 18890 y de la cepa 5P3 descritas en vinagres elaborados por el método sumergido.

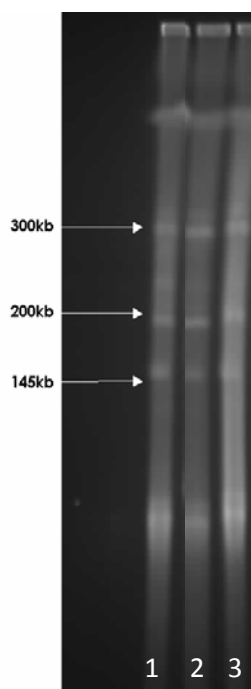


Figura III-14. PFGE del DNA total de tres aislados *Ga. europaeus* 1:R59, 2:R19, 3:R17.

1.8. Identificación a nivel clonal de bacterias acéticas mediante análisis de restricción y PFGE

Para poner a punto el método de PFGE fue necesario encontrar una enzima de restricción que generara un perfil de bandas adecuado, es decir, que presentara un número de bandas entre 10 y 30, y de un tamaño comprendido entre 40 y 600 kb para poder diferenciar entre cepas. De las 6 endonucleasas ensayadas (*SfiI*, *XbaI*, *NotI*, *AluI*, *SmaI* y *SpeI*), la enzima *SpeI* fue la que generó perfiles de restricción más discriminantes. Se emplearon para la puesta a punto del método 10 aislados de BA diferentes. Además se empleó como herramienta adicional el software INSILICO (<http://insilico.ehu.es/digest/>) que simula la digestión y posterior separación de los fragmentos de DNAs, y los resultados mostraron que las simulaciones de INSILICO coincidían con los datos obtenidos experimentalmente con las seis enzimas de restricción. El DNA total digerido con la enzima *SpeI* generó 10-18 bandas de tamaño 100-600 kb, adecuadas para poder discriminar correctamente las cepas, mientras que las otras endonucleasas generaron o pocas bandas (*NotI*, *SmaI*, *AluI*) o bien demasiados fragmentos (*XbaI*) como para ser discriminantes (datos no mostrados).

La **Figura III-15** muestra las imágenes obtenidas en el análisis por electroforesis de campos pulsados de los fragmentos de restricción con la enzima *SpeI* de los DNA de 77 aislados de BA estudiados. La reproducibilidad del método de análisis de restricción y PFGE se determinó analizando por duplicado los perfiles de 15 aislados de BA. Estos perfiles se incluyeron dentro del dendrograma con todas las cepas, se analizó empleando el coeficiente de Dice (método UPGMA) y se obtuvo el valor de similitud del 85 % para los perfiles de los duplicados del mismo aislado, coeficiente de similitud que resultó mayor que el obtenido en el análisis por ERIC-PCR. Este valor de 85 % fue considerado como el valor límite por encima del cual los perfiles de restricción se consideraron iguales y por debajo del cual se consideran diferentes y pertenecientes a cepas distintas. Utilizando estos criterios además del análisis visual de los perfiles de bandas se obtuvieron los grupos que se observan en el dendrograma de la **Figura III-15**, en la cual aparecen los 22 perfiles de restricción diferentes encontrados para los 77 aislados de BA estudiados. Como se deduce del dendrograma, el porcentaje de similitud entre patrones no relacionados y relacionados (closely related) varía de un 45 % a un 85 % el cual es un valor mayor que el obtenido en el análisis por ERIC-PCR, y el coeficiente de correlación cofenética calculado por el dendrograma fue mayor o igual al 63 %. El índice de diversidad genética calculado según la sección 2.9. de Materiales y Métodos es del 28 %.

La **Tabla III-6** muestra los patrones no relacionados ($n = 17$) y relacionados ($n = 5$) junto al número de aislados que presentaron cada patrón, así como la identificación de especie y el tipo de vinagre del que se aislaron estas 77 BA. Los patrones de BA se clasificaron en dos grupos que se muestran en la **Figura III-15**, con coeficientes de similitud mayores del 45 % dentro de cada grupo (este valor está indicado en la **Figura III-15** con una línea discontinua), el *Grupo 1* con un coeficiente de similitud mayor del 45 % y el *Grupo 2* con más de un 49 % de similitud entre sus correspondientes aislados. Todos los aislados del *Grupo 1* pertenecieron a la especie *Ga. europaeus* e incluye todos los aislados de vinagres de etanol así como aislados de vinagres de vino. Todos los aislados de vinagres de sidra están agrupados juntos en el *Grupo 2*; este grupo presenta la mayor variabilidad de especies: *A. pasteurianus*, *Ga. europaeus*, y *Ga. xylinus*.

Tabla III-6. Patrones obtenidos en el análisis de restricción con *SpeI* y PFGE de 77 aislados de BA del vinagre.

Nombre del patrón	Patrones relacionados	Nº de aislados	Especie	Origen del vinagre
R1		25	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco/tinto y etanol
R3		12	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
R6		1	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
R28		1	<i>A. pasteurianus</i>	Sidra
R30		1	<i>A. pasteurianus</i>	Sidra
R33a		1	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
	R33b	3	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
	R33c	1	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
	R33d	5	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco y etanol
R35		1	<i>Ga. xylinus</i>	Sidra
R36		2	<i>Ga. xylinus</i>	Sidra
R39		2	<i>Ga. europaeus</i>	Sidra
R41		1	<i>Ga. xylinus</i>	Sidra
R46		2	<i>Ga. xylinus</i>	Sidra
R48		4	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco y sidra
R49		2	<i>Ga. xylinus</i>	Vino blanco y sidra
R54a		2	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
	R54b	6	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
R55		2	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
R70		1	<i>Ga. europaeus</i>	Vino blanco
R90a		1	<i>A. pasteurianus</i>	Sidra
	R90b	1	<i>A. pasteurianus</i>	Vino blanco
17 patrones	5 patrones relacionados	77 aislados		

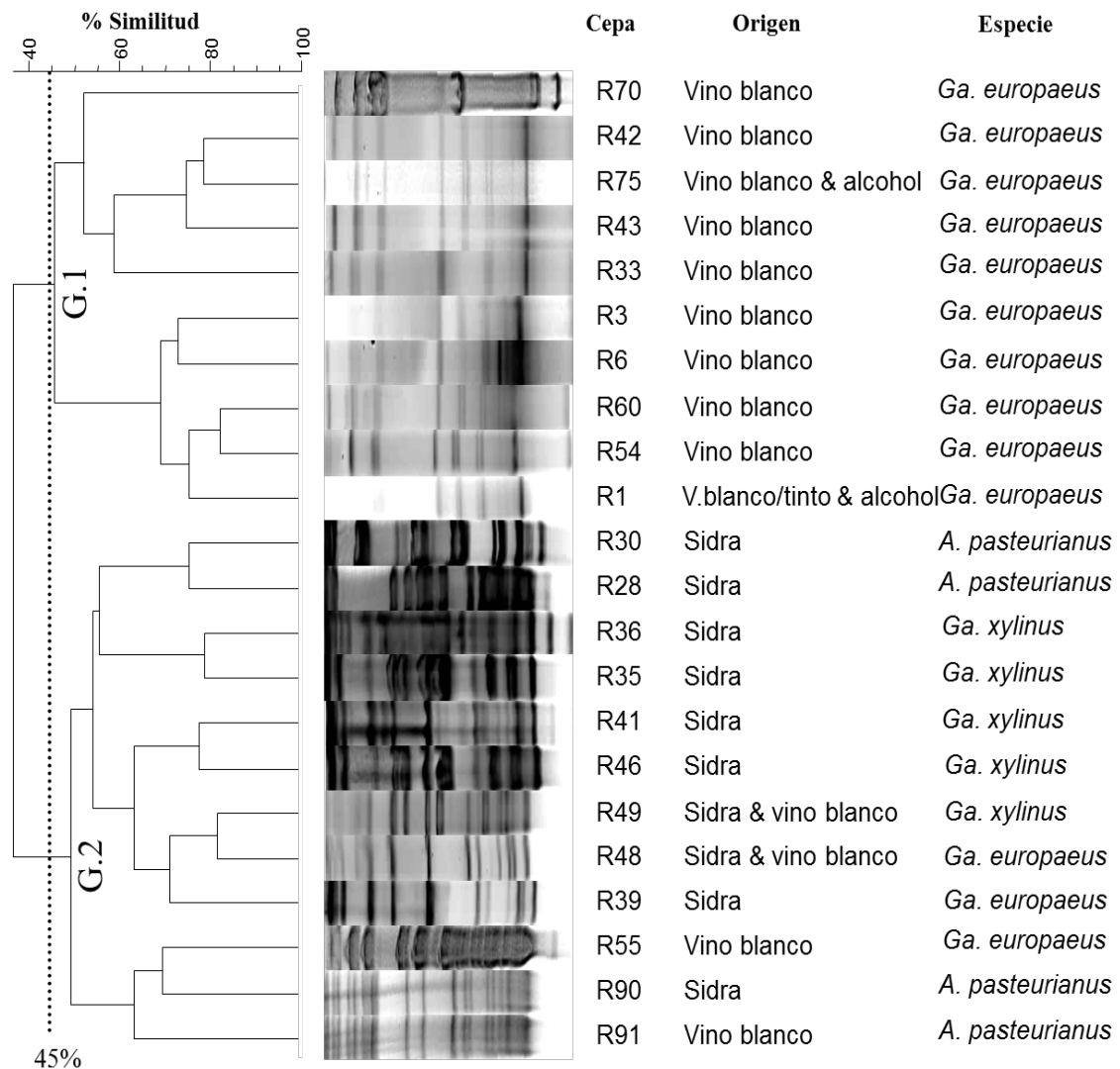


Figura III-15. Patrones de bandas obtenidos mediante digestión con *SpeI* y PFGE de los DNAs bacterianos y dendrograma UPGMA para 77 aislados de BA obtenidos de vinagre.

Como se muestra en la **Tabla III-6**, la cepa más abundante fue *Ga. europaeus* con el perfil de PFGE denominado R1, el cual fue identificado en 25 aislados de diferentes tipos de vinagres de vino (vinagres de vino tinto y blanco) y vinagres de etanol (apareció en 25 de los 77 aislados estudiados). Esta cepa se encontró en muestras de vinagres durante un periodo de 7 meses. La segunda cepa más frecuentemente encontrada fue *Ga. europaeus* con perfil PFGE denominado R3, el cual apareció en 12 aislados obtenidos de vinagres de vino blanco durante un periodo de 5 meses.

En la **Tabla III-7** se muestran las cepas encontradas en cada muestra de vinagre estudiada según el análisis de restricción con *SpeI* y PFGE.

Tabla III-7. Cepas identificadas según el análisis de restricción con *SpeI* y PFGE en cada una de las 32 muestras de vinagre estudiadas.

Muestra de vinagre	Materia prima del vinagre elaborado	Identificación especie	Nombre la cepa/s
1	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	R1, R3
2	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	R1, R6
3	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	R1, R3
4	Vino tinto ecológico	<i>Ga. europaeus</i>	R1
5	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	R1, R3
6	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	R1, R3
7	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	R1, R3
8	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	R3
9	Sidra	<i>A. pasteurianus</i>	R28
10	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	R1
11	Sidra	<i>A. pasteurianus</i>	R30
12	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	R1, R33a
13	Sidra	<i>Ga. xylinus</i>	R35, R36
14	Sidra	<i>Ga. europaeus</i>	R39
		<i>Ga. xylinus</i>	R41
15	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	R33b, R33c
16	Sidra	<i>Ga. xylinus</i>	R46, R49
		<i>Ga. europaeus</i>	R48
17	Vino blanco	<i>Ga. xylinus</i>	R49
		<i>Ga. europaeus</i>	R48
18	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	R54, R55
19	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	R1, R55
20	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	R1, R54b
21	Vino blanco ecológico	<i>Ga. europaeus</i>	R54b
22	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	R54b, R1
23	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	R1
24	Vino tinto	<i>Ga. europaeus</i>	R1
25	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	R1, R70
26	Alcohol	<i>Ga. europaeus</i>	R1
27	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	R1, R54b, R33d
28	Vino tinto	<i>Ga. europaeus</i>	R1
29	Alcohol	<i>Ga. europaeus</i>	R33d
30	Vino blanco	<i>Ga. europaeus</i>	R33d
31	Sidra	<i>A. pasteurianus</i>	R90
32	Vino blanco	<i>A. pasteurianus</i>	R90b

A la vista de las **Tablas III-5 y 7**, en las que se muestran las cepas identificadas por los métodos de ERIC-PCR y PFGE respectivamente, en las muestras con dos o más aislados estudiados se ha encontrado que en un 26 % de las muestras aparecen cultivos puros de una sola cepa. Entre las muestras que presentan cultivos puros se encuentran las muestras de vinagre de alcohol. En el resto de las muestras aparecían al menos dos cepas diferentes en la misma muestra.

Considerando las cepas identificadas por PFGE, en la **Tabla III-7** se puede observar que en los vinagres de alcohol aparecían cultivos puros, encontrándose las cepas R1 o R33d, ambas pertenecientes a la especie *Ga. europaeus*. Estas cepas R1 y R33d también se encontraron en muestras de vinagres de vinos (blanco y tinto), lo cual indica que estas cepas son capaces de adaptarse a condiciones altamente estresantes como las del vinagre de etanol (14 % de alcohol y pocos nutrientes). Estas cepas podrían constituir unos excelentes cultivos iniciadores para estos vinagres.

Según los resultados mostrados en la **Tabla III-7**, las muestras de vinagre de vino blanco presentaron cultivos mixtos de al menos dos cepas diferentes en el 67 % de las muestras y una única cepa en el 33 % de las muestras. Sólo en una muestra de las 21 analizadas de vinagre de vino blanco se encontró un cultivo mixto de diferentes especies: *Ga. xylinus* y *Ga. europaeus*. Sólo en una muestra de vinagre de vino blanco se encontró la especie *A. pasteurianus*, y esta especie no aparecía en las muestras de vino tinto. La cepa R1 apareció en el 56 % de las 32 muestras analizadas por PFGE, en el 75 % de las muestras de vinagre de vino blanco y como única cepa en un vinagre de etanol. La siguiente cepa más abundante fue la cepa R3 que apareció como predominante en seis vinagres de vino blanco.

El índice de diversidad calculado según el apartado 2.9. de Materiales y Métodos para los 77 aislados estudiados por análisis de restricción y PFGE resultó ser del 28 %. Sin embargo para el método de ERIC-PCR el índice de diversidad fue del 37 %, lo cual indica que la variabilidad de cepas detectada es mayor con el método de ERIC-PCR que con PFGE. A diferencia de ERIC-PCR, el método de PFGE permitió agrupar los aislados por origen del vinagre.

Para los vinagres de sidra, el índice de diversidad de cepas fue del 77 %, mientras que el índice de diversidad en vinagres de vino blanco fue del 22 %. De forma similar los vinagres de sidra también mostraron una variabilidad de especies más alta (*A. pasteurianus*, *Ga. xylinus* y *Ga. europaeus*) entre sus aislados que los vinagres de vino tinto y alcohol (**Tabla III-2**). Estos resultados se podrían explicar, como ya se ha mencionado anteriormente, por el alto contenido en azúcares (4 %) ([Del Campo et al., 2008](#)) y el bajo contenido en etanol (6 %) de las sidras que favorecería el crecimiento de diferentes especies y cepas, mientras que vinagres de vinos (12 % etanol) y vinagres de etanol (14 % etanol) presentan condiciones más estresantes y selectivas para el crecimiento bacteriano.

Como ya se describió en el apartado 2.1. de la sección de Materiales y Métodos, la elaboración de los vinagres estudiados se realizaba mediante diferentes ciclos de carga y descarga donde se dejaba aproximadamente un 50 % del vinagre en el fermentador “arrancador” y se añadía otro 50 % de la materia prima (sustrato de la bacteria), sirviendo este acetador para arrancar la fermentación de otros. Por ello la diversidad de cepas se amplía (además de las presentes en la fermentación en curso) por la distinta naturaleza y procedencia de los vinos y sidras utilizados en la elaboración del vinagre.

Los estudios de identificación a nivel de cepa comenzaron a proliferar con la aparición de las técnicas basadas en el DNA y la diferenciación de cepas de la misma especie ha sido siempre un reto (Bartowsky & Henschke 2008). Algunos autores utilizan ERIC-PCR como el método de tipificación para BA, y este método ha sido utilizado para la identificación a nivel de cepa de aislados de *A. pasteurianus* de vinagres balsámicos tradicionales (Gullo *et al.*, 2009), de vinagres de arroz (Nanda *et al.*, 2001) y de vinagres de vino (Vegas *et al.*, 2010). También la técnica de RAPD-PCR se ha utilizado para la identificación a nivel de cepa de aislados de BA, y así se identificaron por este método cepas de *A. pasteurianus* en vino tinto estropeado (Bartowsky *et al.*, 2003), en vinagres de arroz elaborados por el método tradicional (Nanda *et al.*, 2001) y para tipar aislados de BA de viñedos de Chile (Prieto *et al.*, 2007). La técnica de ERIC-PCR ha sido utilizada en combinación con otras técnicas como REP-PCR para estudiar las especies y evolución de cepas en la población de BA presentes en la elaboración de vino (González *et al.*, 2005), en la elaboración de vinagre de vino por el método tradicional (Vegas *et al.*, 2010) o en el estudio de las BA presentes en uvas sanas de las Islas Canarias (Valera *et al.*, 2011). También mediante REP-PCR se han tipado aislados de BA de granos de cacao fermentados de Ghana (De Vuyst *et al.*, 2008).

En este estudio elegimos una técnica basada en el análisis por amplificación del DNA y otra basada en el análisis de restricción del DNA. Al comparar los resultados obtenidos en el análisis por ERIC-PCR (**Figura III-13**) con los obtenidos en el análisis de restricción y PFGE (**Figura III-15**) se identificaron un total de 43 clones de BA distintos, y se observa que los grupos generados por los patrones de ERIC-PCR no correlacionan con el origen del aislado ni la especie, mientras que los grupos generados por los patrones de restricción por PFGE correlacionan con el origen de los aislados (*Grupo 1* incluye aislados de vinagres de vino y etanol, perteneciendo exclusivamente a la especie *Ga. europaeus*, y el *Grupo 2* incluye aislados de sidra y vino y son de varias especies). Estos resultados sugieren que el método de análisis de restricción y PFGE es el método a elegir

para estudiar y clasificar cepas de BA. Los estudios de [López y col. \(2008\)](#) y de [Cleenwerck & De Vos \(2008\)](#) también coinciden en señalar que el método de tipificación con PFGE utilizando la enzima de restricción adecuada ofrece la mayor capacidad de discriminación para diferenciar cepas de la misma especie. Cabe señalar, sin embargo que el método de PFGE es más laborioso y por tanto más largo (4 días) que el método de ERIC-PCR (duración de 6 horas), el cual sería un método apropiado para seguir el proceso de fermentación de un biorreactor que ha sido inoculado con una cepa específica de BA bien caracterizada por este método y que se desee seguir su evolución.

2. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE LAS BACTERIAS PARA FORMAR BIOFILM

2.1. Optimización del método para la determinación de la capacidad formadora de biofilm de las bacterias lácticas

En primer lugar fue necesario poner a punto el método descrito en el apartado 3.2. de la sección de Materiales y Métodos, basado en el ya descrito por O'Toole *et al.*, (1998). Inicialmente, tal y como estaba descrito, se utilizaron placas de poliestireno estériles de 96 pocillos de fondo redondo y de fondo plano tratadas para favorecer la adhesión celular. Los resultados obtenidos mediante la tinción con cristal violeta en estas placas no fueron válidos, ya que la absorbancia obtenida para los controles negativos era muy elevada debido a que el plástico retenía gran parte del cristal violeta (datos no mostrados). Es por ello que se pasó a utilizar tubos de cristal que no retenían el colorante, y otros estudios también indicaban el uso de placas de cristal (Fujii *et al.*, 2008). Se utilizó para estos ensayos la cepa *Pseudomonas aeruginosa* C2803 como control positivo de formación de biofilm y se estudiaron 7 cepas enológicas de BL de las especies *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus hilgardii* y *Lactobacillus plantarum*. Los resultados mostraron que el tiempo de incubación óptimo era 48 horas, la temperatura de incubación óptima 25°C, y utilizando 200 µl (añadidos a 3 ml de medio) de un inóculo con una D.O._{660nm} de 0,4-0,5 (medida en cubeta de 1 mm de ancho) en solución salina estéril. Asimismo, se consideró la formación de biofilm positiva para valores de D.O._{600nm} ≥ 1, tal y como se describe en la bibliografía (Kubota *et al.*, 2008; Peters *et al.*, 2008).

2.2. Análisis de la capacidad formadora de biofilm de bacterias lácticas

Una vez puesto a punto el método, se realizó el screening de la capacidad de formar biofilm de las 69 cepas de bacterias lácticas de origen enológico mostradas en la **Tabla II-3** del apartado 3.1. de Material y Métodos. Los resultados obtenidos para todas las cepas analizadas se muestran a continuación en las **Figuras III-16, 17, 18 y 19** donde se representan los resultados para la formación de biofilm clasificadas por especies (*L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *O. oeni* y para el resto de especies de bacterias lácticas analizadas).

En las gráficas se puede apreciar que entre las 69 cepas analizadas (10 especies diferentes de BL), sólo 4 de ellas (el 5,8 % del total) presentaron una D.O._{600nm} mayor de 1 en el ensayo y por tanto resultaron ser positivas para la formación de biofilm: 1 cepa de *Lactobacillus plantarum*

(J39), 2 cepas de la especie *Leuconostoc mesenteroides* (J32 y J57) y 1 cepa de *Oenococcus oeni* (IS151).

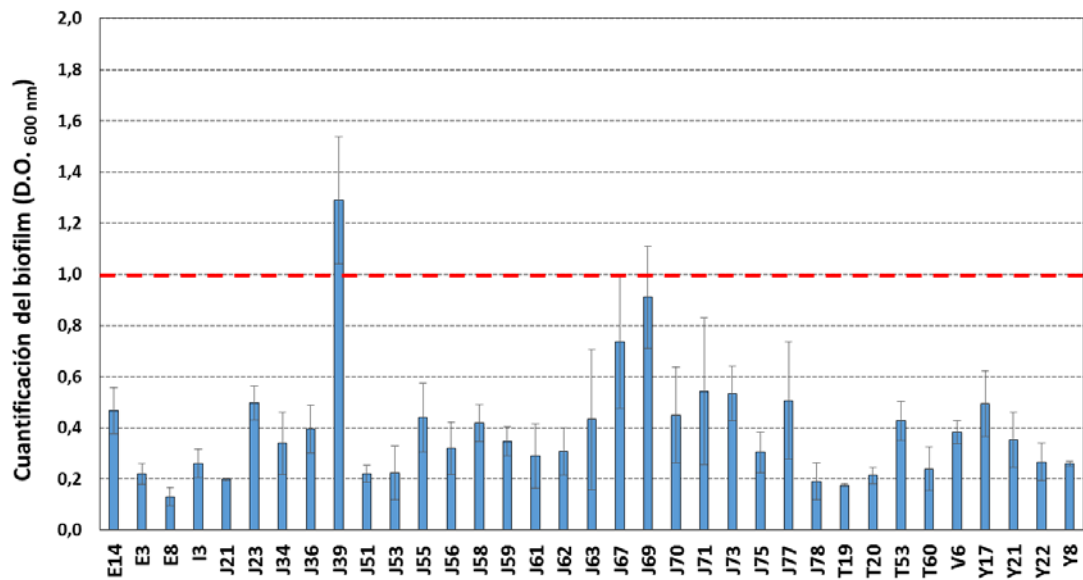


Figura III-16. Cuantificación de biofilm de las cepas de la especie *Lactobacillus plantarum* estudiadas. El valor de $D.O_{600nm} \geq 1$ fue considerado para la formación de biofilm positiva.

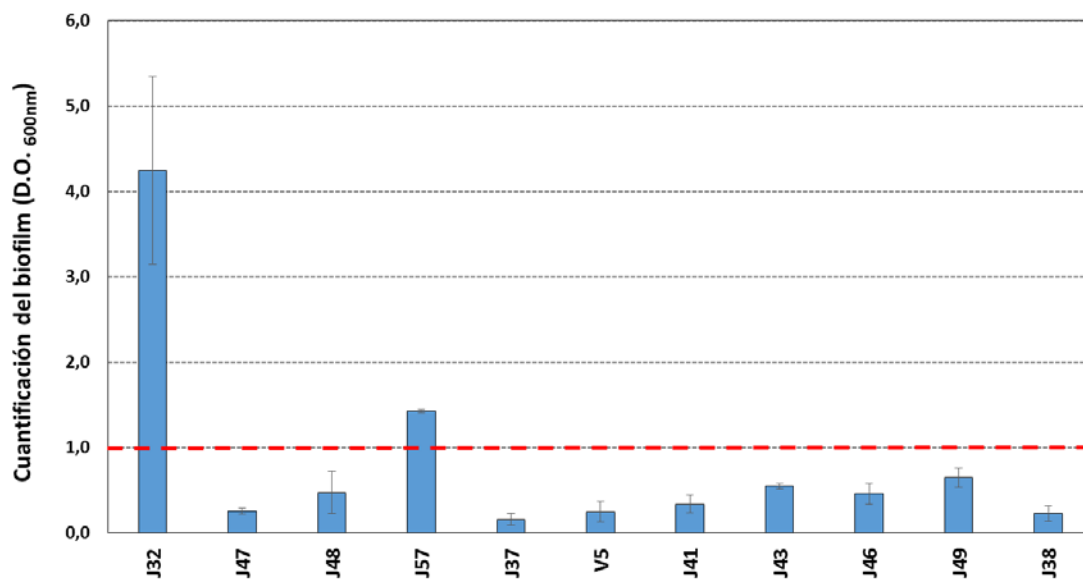


Figura III-17. Cuantificación de biofilm de las cepas de la especie *Leuconostoc mesenteroides* estudiadas. El valor de $D.O_{600nm} \geq 1$ fue considerado para la formación de biofilm positiva.

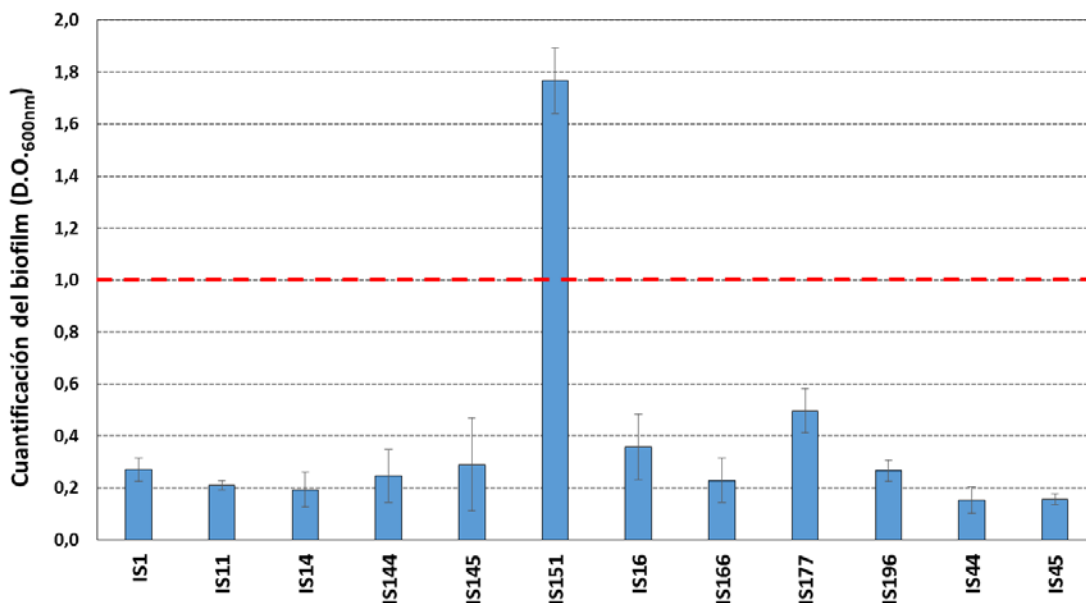


Figura III-18. Cuantificación de biofilm de las cepas *Oenococcus oeni* estudiadas. El valor de D.O._{600nm} ≥ 1 fue considerado para la formación de biofilm positiva.

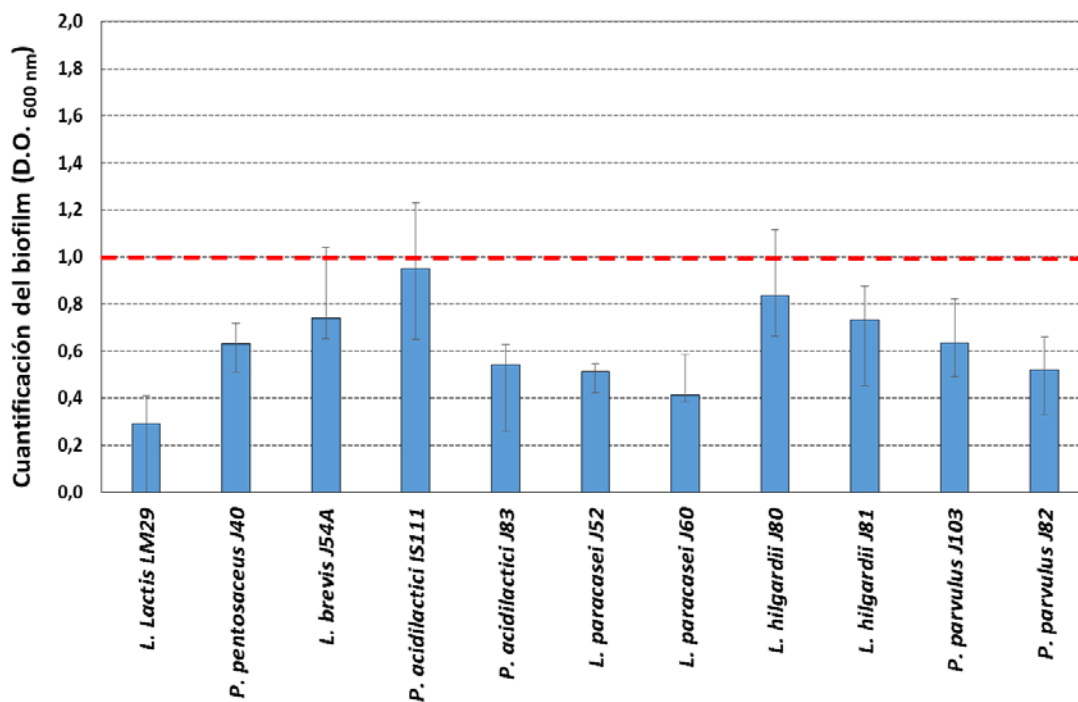


Figura III-19. Cuantificación de biofilm para el resto de especies de bacterias lácticas estudiadas (*Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus hilgardii* y *Pediococcus parvulus*). El valor de D.O._{600nm} ≥ 1 fue considerado para la formación de biofilm positiva.

La cepa *L. mesenteroides* J32 fue la que presentó la mayor cantidad de biofilm formado en el medio BHI. Las dos cepas de *L. mesenteroides* formadoras de biofilm fueron aisladas de uva (J32) y de vino en fermentación maloláctica (J57). La cepa *O. oeni* IS151 se aisló de un vino al final de la fermentación maloláctica, y *L. plantarum* J39 de un vino terminado.

Según la bibliografía, BL de los géneros *Pediococcus*, *Oenococcus* y *Lactobacillus* aisladas de sidra y de vino han sido descritas como productoras de exopolisacáridos (EPS), más concretamente de β -D-glucanos, los cuales están asociados con un aumento de viscosidad en el medio y con el carácter "ropy" u oleoso que pueden adquirir vinos y sidras cuando sufren la alteración del "ahilado" o "de la grasa" (Ibarburu *et al.*, 2010; Dols-Lafargue *et al.*, 2008). También la especie *L. mesenteroides* ha sido descrita como una importante productora de EPS y formadora de biofilm, y con respecto a la elaboración de bebidas alcohólicas (Montersino *et al.*, 2008) ya en el año 1954 se publicó que en sidras y en vinos de frutas podían aparecer dextranos de alto peso molecular producidos por *L. mesenteroides*, especialmente cuando se había adicionado sacarosa para favorecer la fermentación alcohólica. El trabajo de Montersino y col. (2008) mostró que el 94 % de los aislados *L. mesenteroides* de uvas y vinos que estudiaron eran productores de EPS. Se ha descrito para BL de esta especie en cultivos en forma planctónica la producción de EPS solubles, homopolisacáridos de α -D-glucosa, mientras que el biofilm de *L. mesenteroides* presenta una matiz insoluble constituida por una mezcla compleja de distintos α -D-glucanos (Leathers *et al.*, 2011).

En nuestro estudio la cepa *L. mesenteroides* J32 aislada de uva fue la mayor productora de biofilm frente a las otras tres cepas aisladas de vinos. Este resultado se puede explicar por ese distinto origen de las cepas. El crecimiento sobre la superficie sólida de la uva exige una mayor capacidad de adhesión de las bacterias y obliga a un crecimiento en biofilm sobre la superficie colonizada. Por el contrario, el crecimiento en un medio líquido que sufre turbulencias debidas a burbujas de CO₂ y manipulaciones de la elaboración, no favorece la formación del biofilm.

L. plantarum también se describe como una especie formadora de biofilm (Badel *et al.*, 2011) y se ha determinado para una cepa *L. plantarum* productora de EPS la composición del heteropolisacárido producido, en el cual se encuentran los monosacáridos: manosa, fructosa, galactosa y glucosa (Wang *et al.*, 2015). Uno de los genes implicados en la formación del biofilm en *L. plantarum* se ha identificado como el gen *ftsH*, codificante de una metaloproteasa dependiente del ATP y que es activada en diversas condiciones de estrés para la bacteria, como son el calor, frío, acidez, presencia de sales biliares o estrés oxidativo (Bove *et al.*, 2012). Por otro lado, el sistema de control de la adherencia a superficies, y por tanto de la formación del biofilm, en *L. plantarum* se encuentra regulado por un sistema "quorum sensing" compuesto por una

proteína-quinasa de membrana, un regulador de la respuesta y un péptido autoinductor, todos ellos codificados por genes que constituyen el operón denominado *lam* BDCA (Fujii *et al.*, 2008). Otros trabajos posteriores de Muscariello y col. (2013) sobre los mecanismos de control génico de la formación del biofilm en *L. plantarum* identificaron los genes denominados *flmA*, *flmB* y *flmC* como responsables de la formación del biofilm, siendo los tres genes codificantes de proteínas con una hipotética función como reguladores transcripcionales potencialmente implicados en el mantenimiento de la pared celular.

Para *O. oeni* también se ha descrito la capacidad de formar biofilms, y respecto a la composición de EPS de *O. oeni*, se ha descrito la producción de un beta-glucano y dos heteropolisacáridos, uno de ellos formado por unidades de galactosa y glucosa, y el otro compuesto por unidades de galactosa, glucosa y ramnosa (Ibarburu *et al.*, 2007). Según un reciente estudio de Dimopoulou y col. (2014) en esta especie los genes relacionados con la biosíntesis de EPS responsables de la formación de biofilms son muy numerosos (clusters *eps1* y *eps2*, glicosil-transferasas y glicosil-hidrolasas), ocupan buena parte de su reducido genoma y se encuentran en la totalidad de los genomas estudiados de *O. oeni*. Sin embargo, si bien es necesario, no es suficiente la presencia de estos genes para que la bacteria forme biofilm, puesto que la síntesis de EPS parece estar altamente regulada y tiene un alto coste energético (Dimopoulou *et al.*, 2014). Este hecho está de acuerdo con nuestros resultados ya que en el screening que realizamos, únicamente el 8,3 % de las cepas enológicas de la especie *O. oeni* mostraron la capacidad de formar biofilm.

2.3. Visualización del biofilm al microscopio

En la **Figura III-20** se muestran algunas de las fotografías obtenidas en la visualización bajo microscopio óptico de fragmentos de biofilms formados por la cepa *L. mesenteroides* J32 en las condiciones indicadas en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos, y teñidos con cristal violeta. Se puede apreciar la estructura laminar del biofilm así como las células teñidas.

En la **Figura III-21** se pueden observar diferentes imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia de fragmentos de biofilms de la misma cepa J32, teñidos en este caso con las sondas: Syto 9 de coloración verde (tiñe células viables, con la membrana plasmática intacta), y yoduro de propidio de coloración roja (tiñe células no viables).

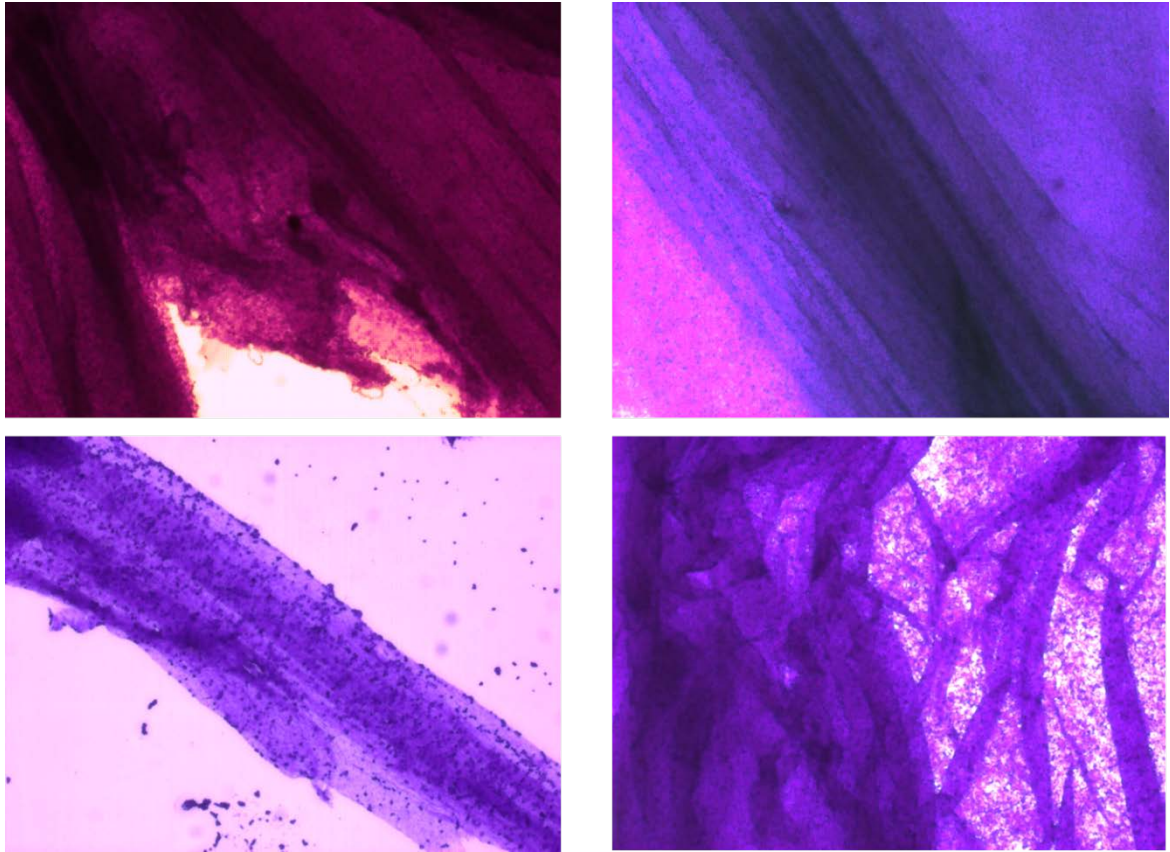
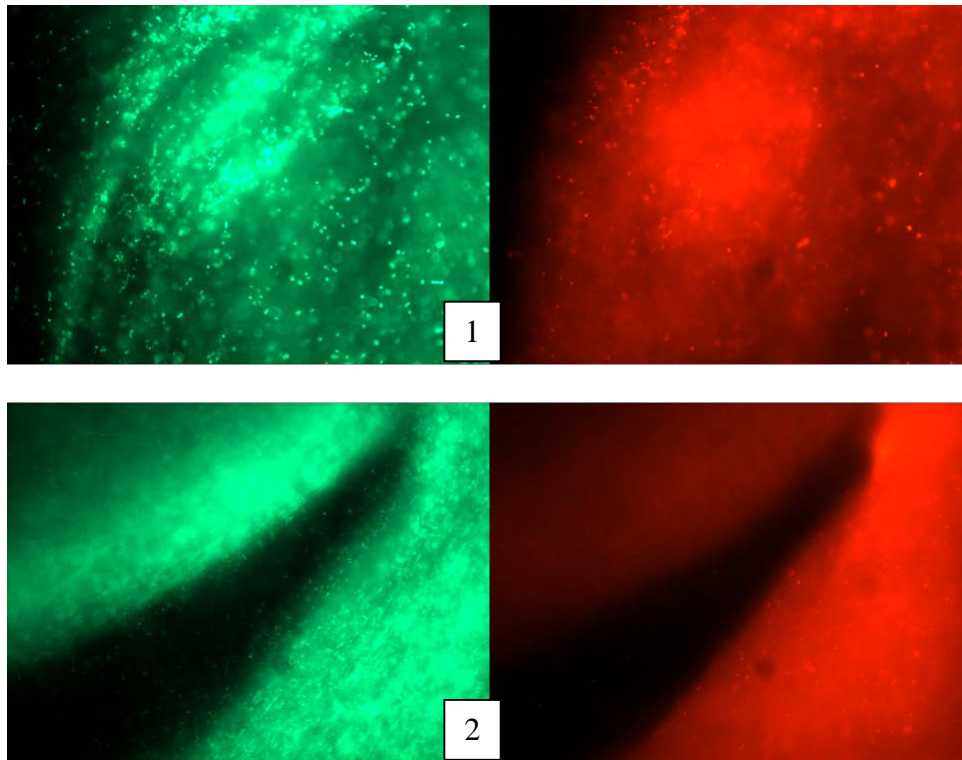


Figura III-20. Fragmentos del biofilm de la cepa J32 teñidos con cristal violeta y visualizado en el microscopio con 400 aumentos.



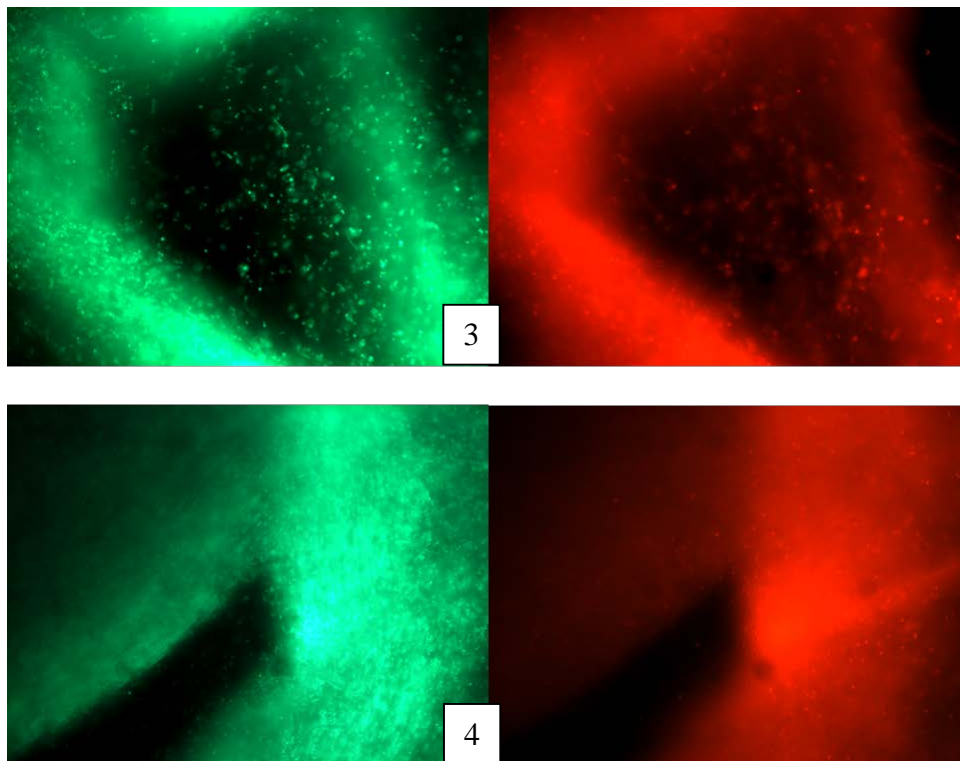


Figura III-21. Fragmentos del biofilm de la cepa J32 teñidos con las sondas SYTO 9 (células vivas de color verde) y yoduro de propidio (células muertas de color rojo) visualizados con 400 aumentos.

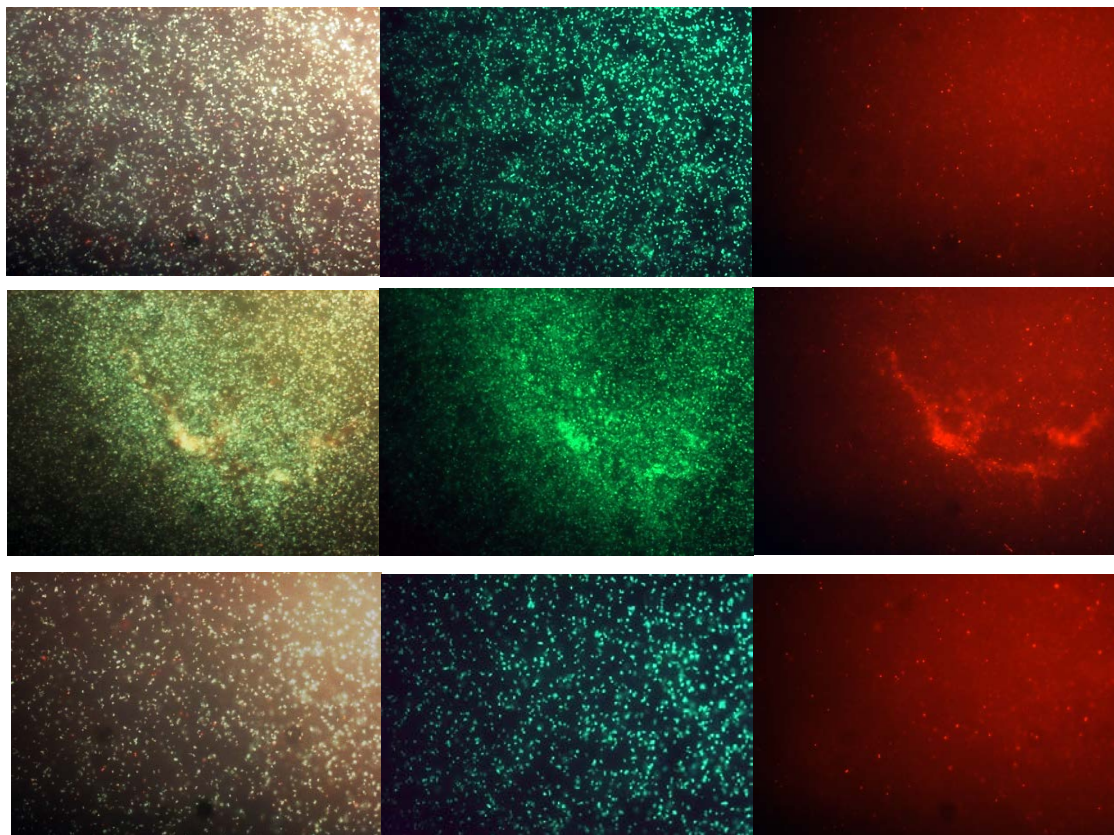


Figura III-22. Fragmentos del biofilm de la cepa J32 teñidos con las sondas SYTO 9 (células vivas de color verde) y yoduro de propidio (células muertas de color rojo) y con ambas sondas visualizadas a la vez mediante el uso de un filtro triple (emisión a 460, 520 y 600 nm) y con 400 aumentos.

El método de tinción con el kit LIVE/DEAD utilizado anteriormente para recuento de BA y BL, resulta adecuado para teñir células del biofilm (**Figuras III-21 y 22**). En las fotos se puede apreciar la diferencia entre células viables (verdes) y no viables (rojas). El método de cuantificación de células viables y no viables en forma planctónica mediante esta tinción con las sondas fluorescentes es un método rápido y eficaz para BA (células Gram-negativas) y BL (células Gram-positivas), tal y como se muestra en los apartados 1.3 y 1.4 de Resultados y Discusión, sin embargo, como se observa en las **Figuras III-21 y 22**, no es un método apropiado para la cuantificación de células viables/no viables en el biofilm puesto que no es posible contar las células, las cuales aparecen superpuestas en las diferentes capas del biofilm. Otros estudios sobre la cuantificación del biofilm de *Candida albicans* (Jin *et al.*, 2005) o del biofilm oral (Tawakoli *et al.*, 2013) con estas mismas sondas están de acuerdo en que este método proporciona resultados semi-cuantitativos (Pantarella *et al.*, 2013).

2.4. Crecimiento de bacterias lácticas en presencia de etanol

Puesto que la formación de biofilms bacterianos supone un importante factor de riesgo en la industria alimentaria (Winkelstroter *et al.*, 2014), y se encuentra asociada a un mecanismo de resistencia al ataque de los agentes antimicrobianos y desinfectantes (Bridier *et al.*, 2011), se realizó este estudio de la tolerancia al etanol de las BL en forma planctónica (células libres) y formando biofilms de las cuatro cepas de BL que habían dado positivo en el screening realizado con el método anteriormente puesto a punto: *Leuconostoc mesenteroides* (J32, J57), *Lactobacillus plantarum* J39 y *Oenococcus oeni* IS151.

En este ensayo se estudió la tolerancia de estas cuatro cepas de BL a la presencia de etanol en el medio de cultivo cuando crecen en forma planctónica, empleando para ello el procedimiento descrito en el apartado 3.5.b) de Materiales y Métodos, y en las siguientes figuras (**Figuras III-23, 24, 25 y 26**) se muestran los resultados obtenidos en el cultivo de las cepas en el medio MRS con diferentes concentraciones de etanol y con agitación para evitar la formación de biofilm.

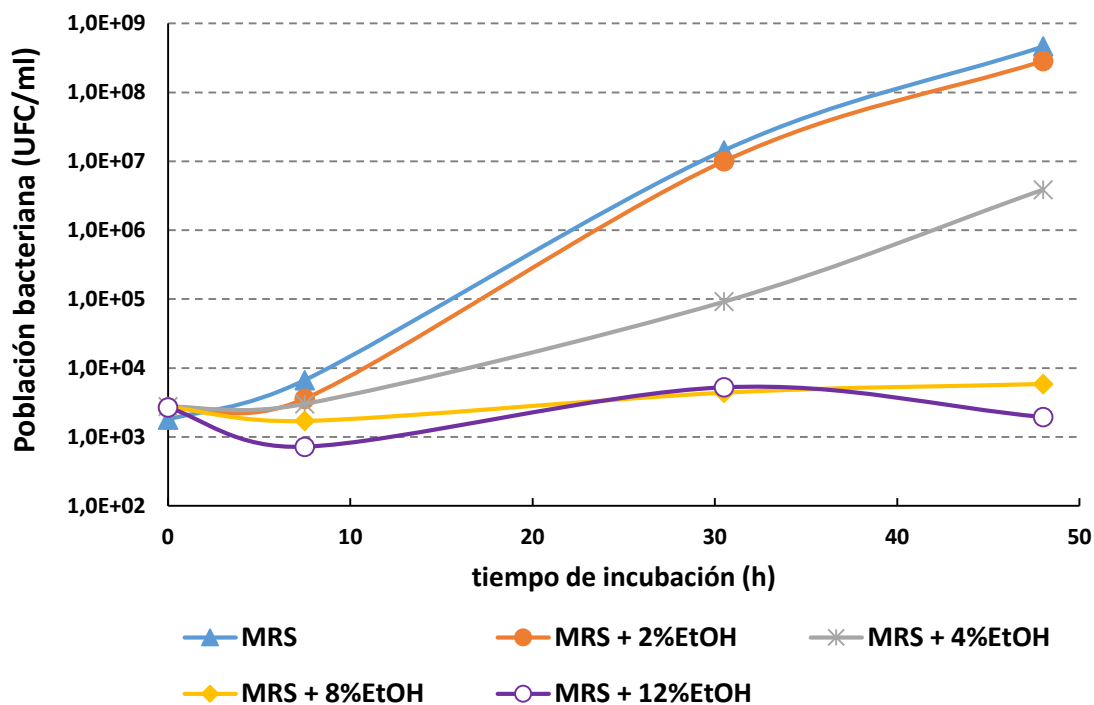


Figura III-23. Curvas de crecimiento de la cepa *L. mesenteroides* J32 en forma planctónica en el medio MRS con las concentraciones de etanol: 0, 2, 4, 8 y 12 % (v/v).

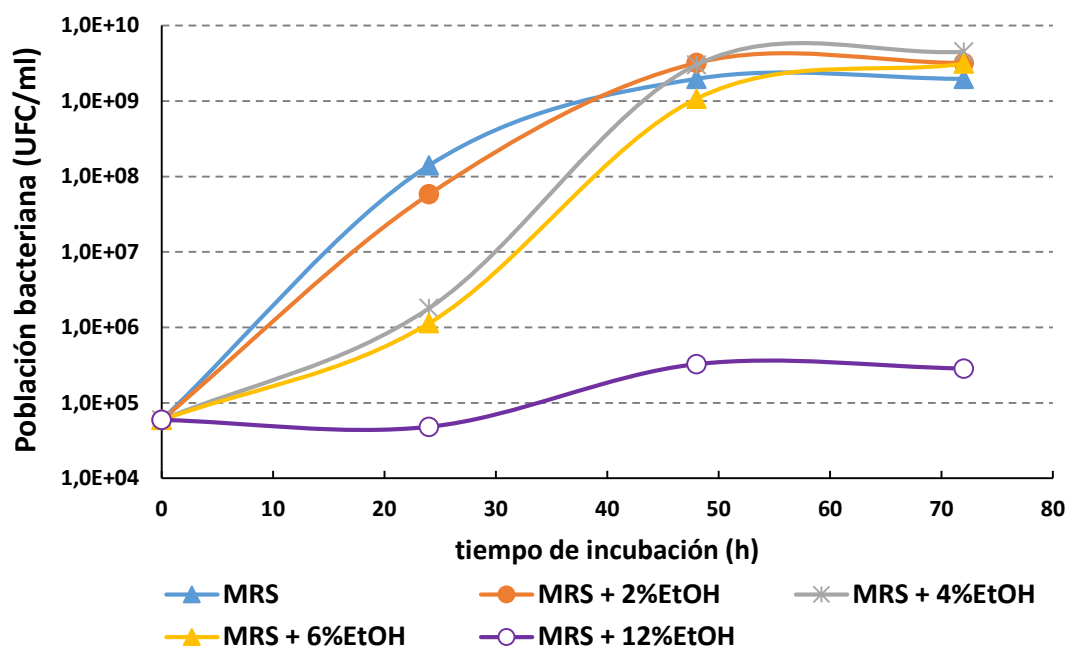


Figura III-24. Curvas de crecimiento de la cepa *L. mesenteroides* J57 en forma planctónica en el medio MRS con las concentraciones de etanol: 0, 2, 4, 8 y 12 % (v/v).

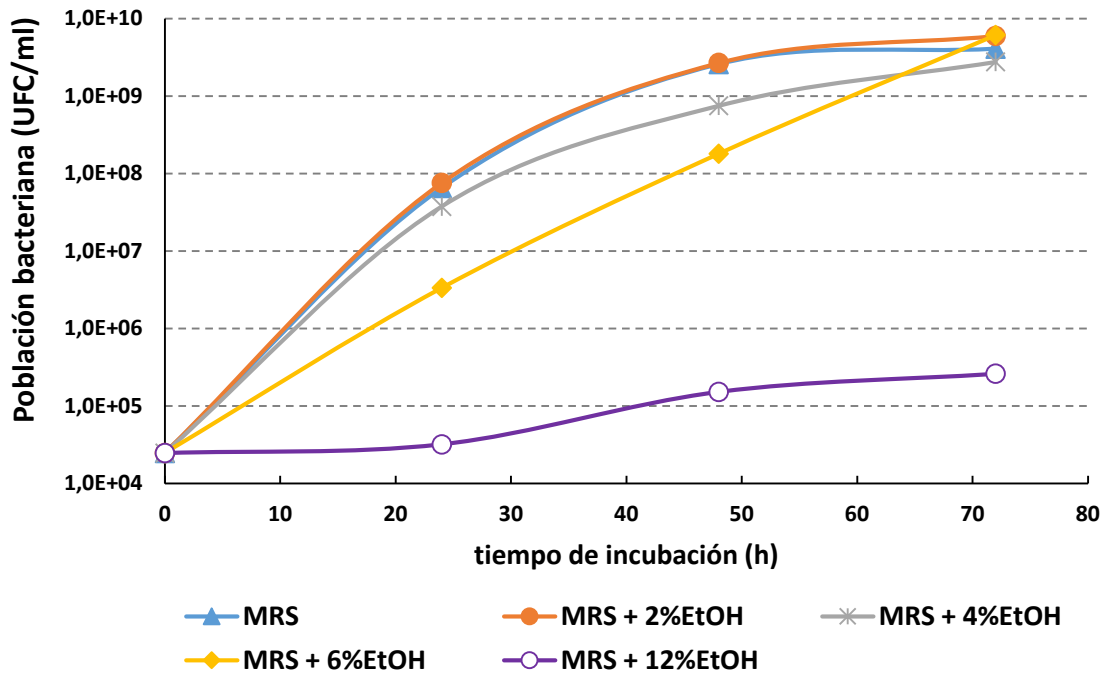


Figura III-25. Curvas de crecimiento de la cepa *L. plantarum* J39 en forma planctónica en el medio MRS con las concentraciones de etanol: 0, 2, 4, 8 y 12 % (v/v).

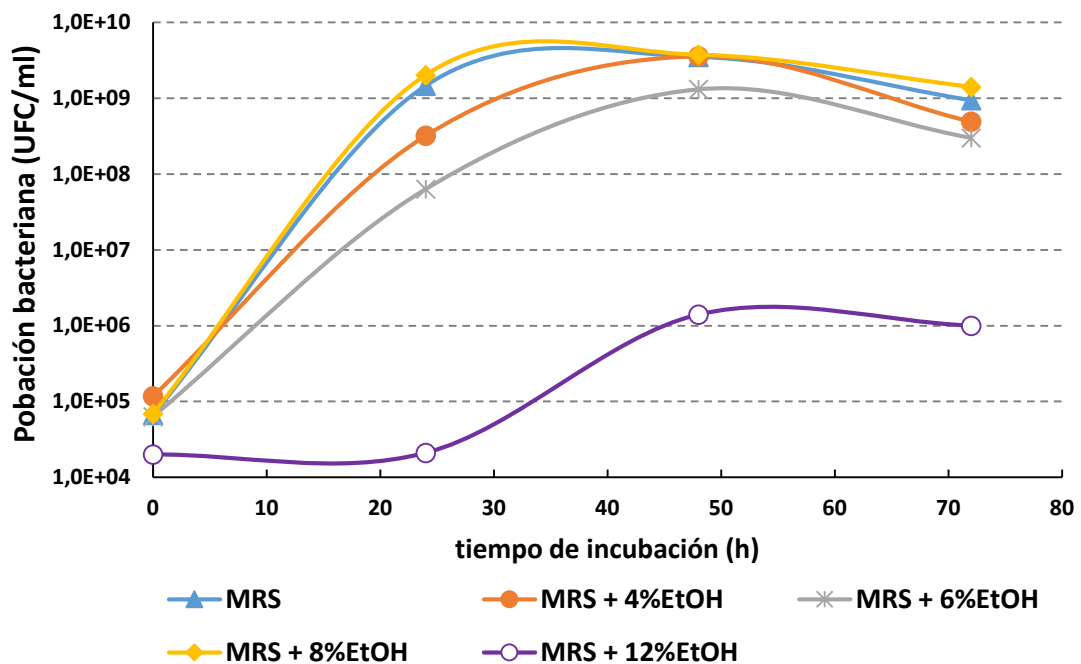


Figura III-26. Curvas de crecimiento de la cepa *O. oeni* IS151 en forma planctónica en el medio MRS con las concentraciones de etanol: 0, 2, 4, 8 y 12 % (v/v).

En las figuras se observa que todas las cepas crecían de manera similar cuando no había etanol en el medio, alcanzando una población del orden de 10⁹-10¹⁰ UFC/ml. Cuando había etanol en el medio de cultivo, el comportamiento de las cepas fue diferente. La cepa *L. mesenteroides*

J32 no vio afectado su crecimiento con un 2 % de etanol, sin embargo con un 4 % su crecimiento se ralentizó, alcanzando poblaciones menores, no siendo capaz de crecer con un 8 y 12 % (**Figura III-23**). Las cepas *L. mesenteroides* J57 y *L. plantarum* J39 fueron capaces de crecer con hasta un 6 % de etanol en el medio y alcanzaron poblaciones similares a las alcanzadas en ausencia de etanol, sin embargo un 12 % de etanol hizo que estas cepas no crecieran (**Figuras III-24 y 25**). Sin embargo *O. oeni* IS151 fue capaz de crecer con hasta un 8 % de etanol en el medio de manera similar a como lo hacía en ausencia de etanol, e incluso con un 12 % de etanol pudo aumentar su población, a diferencia de las otras cepas (**Figura III-26**). Estos resultados están de acuerdo con la bibliografía (Flanzy 2000; Suárez e Iñigo 2004) donde se describe que la tasa de crecimiento de las BL del vino disminuye progresivamente y linealmente hasta una concentración de etanol del 14 %. Aunque también existen algunas cepas capaces de crecer en vinos donde el contenido de etanol alcanza valores más elevados, incluso 20 % (v/v) (Flanzy 2000).

Nuestros ensayos muestran que la especie *O. oeni* es la más tolerante el etanol, lo cual está también de acuerdo con los conocimientos previos sobre BL enológicas y trabajos donde se describe que la especie *O. oeni* activa su crecimiento cuando en el medio existen pequeñas concentraciones de etanol, hasta un 7 %, siendo capaz de crecer con un 12-13 % de etanol (G.-Alegría *et al.*, 2004). Otro estudio más reciente de Bordas y col. (2013) también muestra que las cepas de *O. oeni* aisladas de vinos de Cataluña toleran una concentración de etanol del 14 % o incluso mayor. Esta tolerancia al etanol de la especie *O. oeni* se encuentra relacionada, entre otras razones, con una elevada expresión del gen *ggpps* (codificante de una geranil-geranil pirofosfato sintasa) (Cafaro *et al.*, 2014) que permitiría estabilizar las membranas, produciéndose menos perturbaciones por efecto del etanol. La expresión de la proteína pequeña de estrés Lo18 codificada por el gen *hsp18* también contribuye a esa estabilidad de la membrana de *O. oeni* frente al etanol (Maitre *et al.*, 2014), protegiendo la integridad de la membrana y realizando una función de proteína chaperón. Por otro lado, trabajos anteriores del grupo de la Dra. Aline Lonvaud-Funel (Bourdineaud *et al.*, 2003 y 2004) habían puesto de manifiesto la activación de los genes relacionados con actividades dependientes del ATP *ftsH* (codificante de una metalo-proteasa) y *omrA* (homólogo del gen *lmrA* codificante de una bomba ATP-dependiente transportadora de fármacos) como factores de adaptación y protección de *O. oeni* frente al etanol y el estrés medioambiental. También se ha descrito que *O. oeni* en presencia de etanol y a bajo pH incrementa la expresión de los genes que participan en el metabolismo del citrato (Olguín *et al.*, 2009) con la consecuente producción de compuestos volátiles como el diacetilo (aroma a mantequilla) y el ácido acético (aumento de acidez volátil) derivados del consumo del citrato, que contribuyen a los ya conocidos cambios en el perfil aromático de los vinos cuando éstos realizan

la fermentación maloláctica. Respecto a la tolerancia a la combinación de varias condiciones de estrés, cabe destacar la combinación del estrés de temperatura (14°C) con etanol (14 %) sobre *O. oeni*, que según un estudio de [Chu-ky y col. \(2005\)](#) provoca que la membrana adquiera rigidez y la posterior supervivencia de *O. oeni*, es mayor que cuando esta bacteria ha sido sometida únicamente al estrés de etanol.

Como muestran nuestros resultados y estos trabajos mencionados de otros autores, la especie *O. oeni* es capaz de sobrevivir en las condiciones estresantes del vino y se encuentra adaptada a la presencia de etanol en el medio.

Respecto a la cepa *L. mesenteroides* J32 de nuestro estudio, es la que aparentemente tolera menos el etanol, probablemente debido a que se aisló de uva y no de vino, como las otras cepas, por lo que no había estado previamente en contacto con el medio alcohólico. Tanto la cepa *L. mesenteroides* J57 como *L. plantarum* J39 presentan comportamientos similares a pesar de pertenecer a especies distintas, pero ambas se aislaron de vinos con un nivel considerable de etanol (en plena fermentación maloláctica y vino terminado respectivamente). La tolerancia al etanol de la especie *L. mesenteroides* no se encuentra referenciada en la bibliografía ya que es una BL que normalmente se encuentra en uvas o en mosto en bajas poblaciones, y que tiende a desaparecer progresivamente antes de la fermentación maloláctica ([Lonvaud-Funel et al., 1991](#)). Sin embargo la cepa *L. mesenteroides* J57 utilizada en nuestro estudio fue aislada en fermentación maloláctica y su tolerancia al etanol es comparable a la de *L. plantarum* J39, en ambos casos cepas aisladas de vinos donde el contenido en etanol era considerable, en el rango de 12-13 % (v/v).

La cepa *L. plantarum* J39 de nuestro estudio presentó una tolerancia al etanol intermedia entre *L. mesenteroides* J32 y *O. oeni* IS151, y de forma similar [G.-Alegría y col. \(2004\)](#) describieron que cepas de *L. plantarum* aisladas de vino tinto eran capaces de crecer a pH = 3,2 y con 13 % etanol a 18°C (condiciones normalmente no-viables para BL) de forma parecida a *O. oeni*, más adaptado a crecer en vino. Por otro lado, estudios transcriptómicos han puesto de manifiesto que *L. plantarum* responde al estrés por etanol y como mecanismo de defensa provoca la sobre-expresión de los genes del metabolismo del citrato (igual que en el caso de *O. oeni* indicado anteriormente) y genes responsables de la estructura externa de la bacteria (membrana y pared celular), produciéndose una protección cruzada frente al calor ([Van Bokhorst-van de Veen et al., 2011](#)). Estas respuestas frente al etanol justifican la tolerancia al etanol de *L. plantarum* que también se manifiesta en nuestros resultados.

2.5. Formación de biofilms de bacterias lácticas en presencia de etanol

Una vez estudiado el crecimiento de las BL formadoras de biofilm en presencia de etanol cuando crecen en forma planctónica, se pasó a estudiar la formación del biofilm de las cuatro cepas en presencia de etanol. Se estudió la capacidad de las BL inicialmente en estado planctónico para formar biofilm en el medio BHI con diferentes concentraciones de etanol (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12% v/v) (**Figuras III-27, 28, 29 y 30**) y la tolerancia de un biofilm de células previamente formado en un medio sin etanol a la adición de medio fresco que contenía etanol (BHI con etanol 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 %) e incubación durante 24 horas (**Figuras III-31, 32, 33 y 34**). En estas figuras se representan los resultados obtenidos para la cantidad de biofilm (D.O._{600nm}) y la población bacteriana (UFC/ml) al final de las correspondientes incubaciones para cada una de las cuatro BL estudiadas.

a) Bacterias inicialmente en estado planctónico

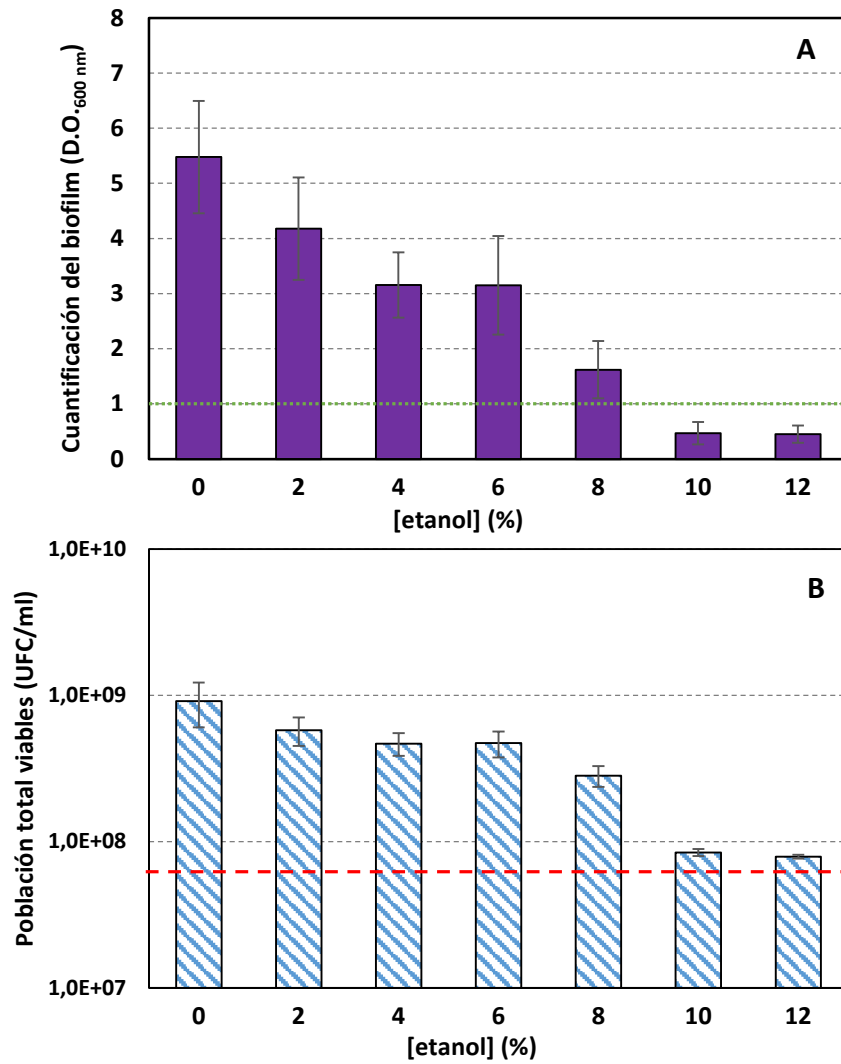


Figura III-27. A) Cuantificación del biofilm formado a las 48 h de incubación de la cepa *L. mesenteroides* J32 en BHI con 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 % etanol (v/v). La línea verde punteada (D.O._{600nm} = 1) indica el límite por encima del cual se considera la formación de biofilm positiva; B) Población de bacterias viables totales a las 48 h de incubación (la línea rayada roja indica la población inicial de células $8,1 \times 10^7$ UFC/ml).

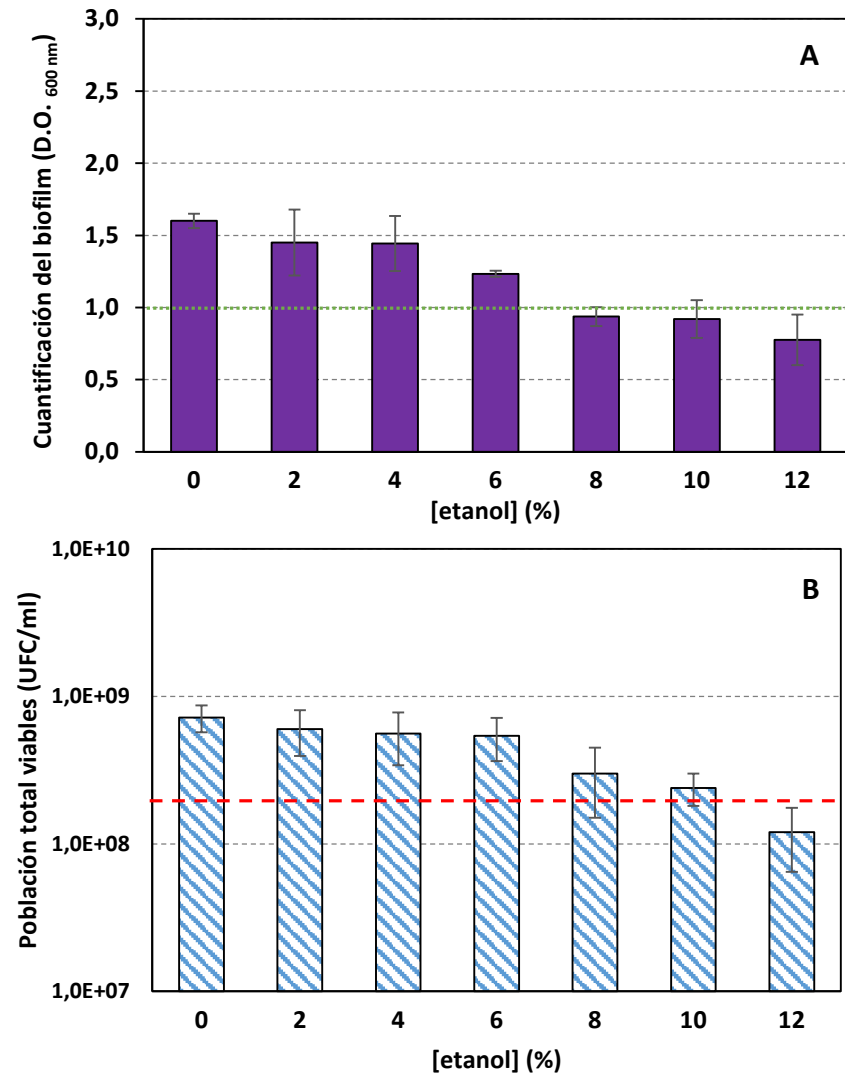


Figura III-28. A) Cuantificación del biofilm formado a las 48 h de incubación de la cepa *L. mesenteroides* J57 en BHI con 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12% etanol (v/v). La línea verde punteada (D.O._{600nm} = 1) indica el límite por encima del cual se considera la formación de biofilm positiva; B) Población de bacterias viables totales a las 48 h de incubación (la línea rayada roja indica la población inicial de células 2×10^8 UFC/ml).

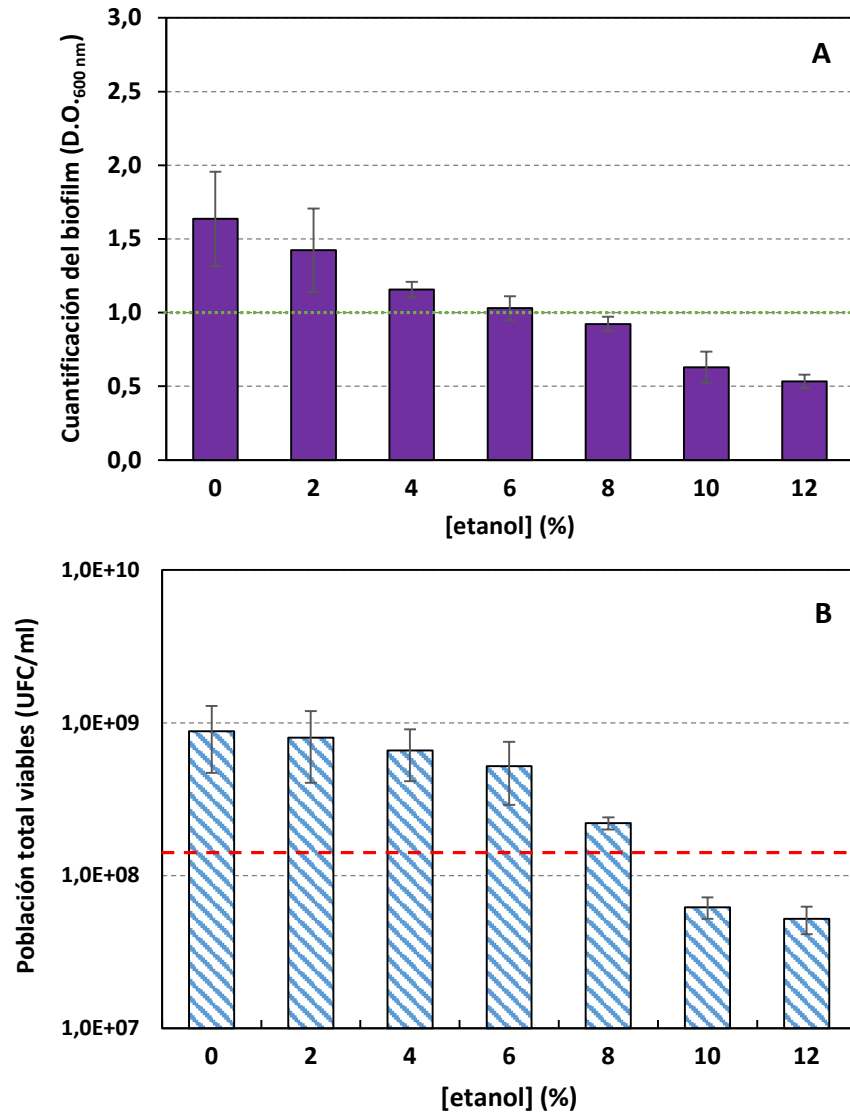


Figura III-29. A) Cuantificación del biofilm formado a las 48 h de incubación de la cepa *L. plantarum* J39 en BHI con 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 % etanol (v/v). La línea verde punteada ($D.O_{600nm} = 1$) indica el límite por encima del cual se considera la formación de biofilm positiva; **B)** Población de bacterias viables totales a las 48h de incubación (la línea rayada roja indica la población inicial de células $1,5 \times 10^8$ UFC/ml).

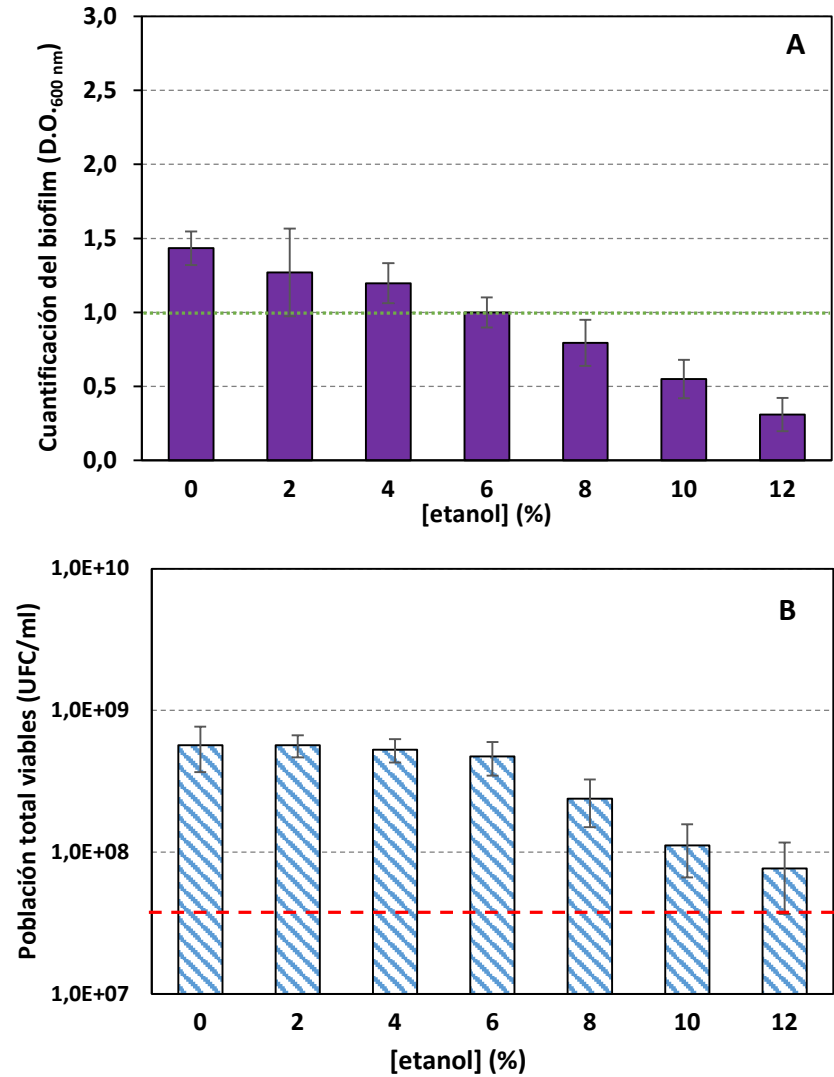


Figura III-30. A) Cuantificación del biofilm formado a las 48 h de incubación de la cepa *O. oeni* IS151 en BHI con 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 % etanol (v/v). La línea verde punteada ($D.O_{600nm} = 1$) indica el límite por encima del cual se considera la formación de biofilm positiva; **B)** Población de bacterias viables totales a las 48 h de incubación (la línea rayada roja indica la población inicial de células 5×10^7 UFC/ml).

Las **Figuras III-27, 28, 29 y 30** anteriores muestran que cuando las cepas estudiadas (J32, J57, J39 e IS151 respectivamente) estaban inicialmente en forma planctónica y se incubaban en un medio con etanol y sin agitación, fueron capaces de inducir y formar biofilm en presencia de hasta un 6 % de etanol en el medio, y únicamente la cepa J32 (**Figura III-27**), la de mayor capacidad formadora de biofilm (>2,3 veces), fue capaz de formar biofilm en presencia de 8 % etanol a pesar de que esta cepa presentaba la menor tolerancia al etanol, tal y como se mostró en la **Figura III-23**. En todos estos casos las BL inicialmente en forma planctónica crecieron en el medio de cultivo con esas concentraciones de etanol, indujeron y formaron el biofilm. Para las concentraciones más elevadas de 10 y 12 % de etanol en el medio, ninguna de las 4 cepas formó biofilm, la población de células viables permaneció constante para las cepas de *L. mesenteroides* (J32 y J57, **Figuras III-27 B y III-28 B**), para *L. plantarum* J39 disminuyó ligeramente (**Figura III-29 B**), y para *O. oeni* IS151 su población aumentó en presencia de esas concentraciones de 10 y 12 % de etanol (**Figura III-30 B**), demostrando de nuevo que era la cepa más resistente al etanol, tal y como se había visto en el apartado anterior (**Figura III-26**). También se observa que en todos los casos en los que las BL eran capaces de formar biofilm, la presencia de etanol en el medio y el progresivo aumento de su concentración se reflejaba en una menor cantidad del biofilm formado (**Figuras III-27 A, III-28 A, III-29 A, III-30 A**), indicando con ello que la presencia de etanol en el medio ejerce un efecto inhibitorio sobre los mecanismos de inducción y formación del biofilm, hasta que en el intervalo de 10 a 12 % etanol desaparecía esa capacidad formadora en las 4 BL estudiadas. Por tanto, nuestros resultados indican que el etanol afecta negativamente al crecimiento de las BL y a su capacidad formadora de biofilm, desapareciendo ésta a una concentración de etanol menor que la necesaria para inhibir totalmente el crecimiento de la BL formadora del biofilm.

Estos resultados están de acuerdo con el modelo para la formación de biofilm propuesto para las bacterias Gram-positivas según el cual, el agente antimicrobiano, en nuestro caso el etanol, inhibe la formación del biofilm actuando a dos posibles niveles: I) podría ejercer su acción actuando como una molécula anti-matriz extracelular, interaccionando con los EPS generados por la bacteria, interfiriendo en la adhesión y en la formación de las estructuras fibrilares e impidiendo la formación del biofilm; II) puede ejercer su acción como molécula bactericida provocando la muerte de las células bacterianas que entran en contacto con ella; de este modo, disminuyendo el número de células viables impide o reduce la formación del biofilm. El etanol ejerce un potente efecto bactericida que se ha venido asociando a su capacidad de interaccionar con los lípidos de la membrana plasmática de las bacterias, provocando la pérdida de la integridad de la membrana, la pérdida de componentes citoplasmáticos y de potencial de membrana, efectos secundarios en el metabolismo y en rutas de respuesta al estrés, y finalmente provocando la muerte celular

(Weber *et al.*, 1996). Este efecto inhibitorio del etanol sobre el crecimiento de las BL ha sido descrito a nivel molecular para las especies *O. oeni* y *L. plantarum*, ambas presentes en los vinos y también responsables de la fermentación maloláctica de los mismos. En el caso de *O. oeni*, tal y como se ha indicado más arriba, quedan implicados en la respuesta al etanol el gen *ggpps* (Cafaro *et al.*, 2014), el gen *hsp18* (Maitre *et al.*, 2014), genes *ftsH* y *omrA* (Bourdineaud *et al.*, 2003 y 2004) y genes del metabolismo del citrato (Olguín *et al.*, 2009). Para *L. plantarum* en la respuesta al estrés ejercido por el etanol está implicada la activación de genes del metabolismo del citrato, genes responsables de la estructura externa de la bacteria (membrana y pared celular) y mecanismos de respuesta al estrés dirigidos por los reguladores transcripcionales HrcA y CtsR (Van Bokhorst-van de Veen *et al.*, 2011). Cabe destacar que en la bibliografía no se han encontrado referencias sobre el efecto del etanol sobre la especie *L. mesenteroides*.

b) Bacterias inicialmente en forma de biofilm

A continuación se muestran los resultados obtenidos cuando se añadía medio con etanol sobre un biofilm de BL previamente formado en ausencia de etanol (**Figuras III-31, 32, 33 y 34**) según se describe en el apartado 3.7. de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos fueron totalmente distintos a los mostrados en las figuras anteriores del apartado a) que se habían obtenido a partir de células en forma planctónica.

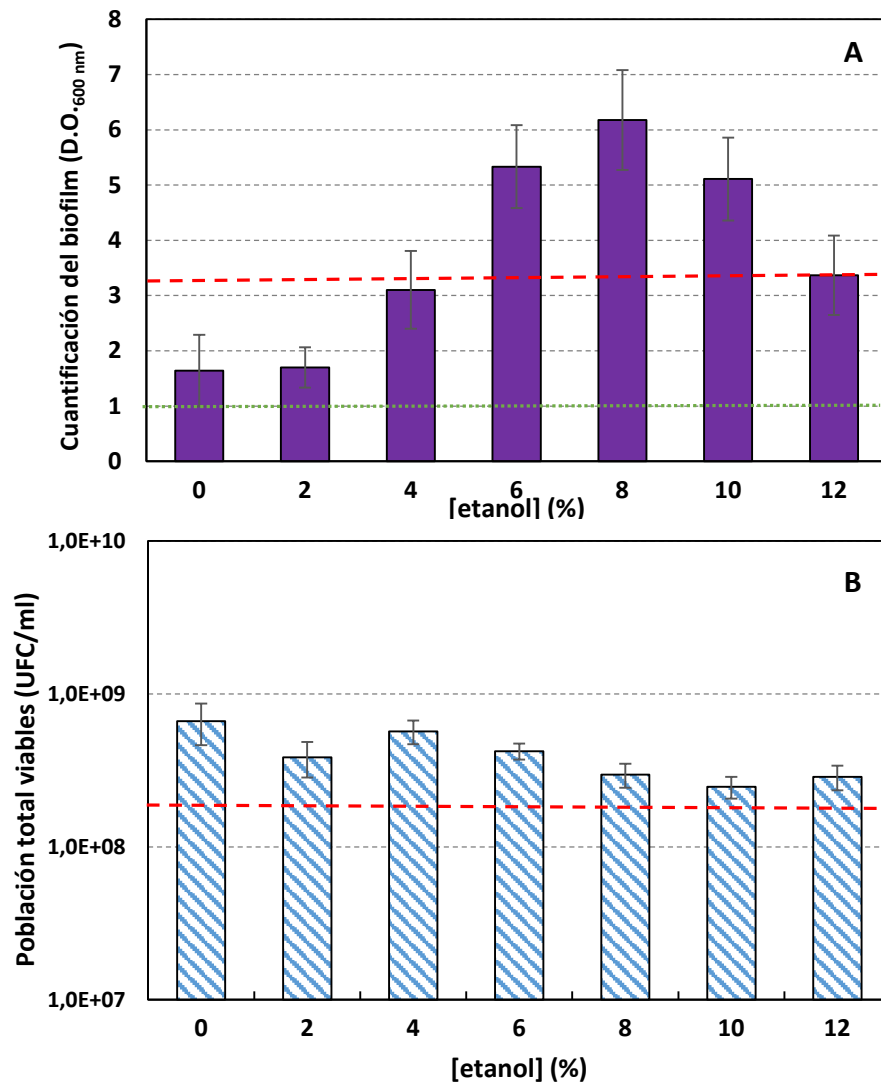


Figura III-31. A) Cuantificación del biofilm de la cepa *L. mesenteroides* J32 después de 24h de incubación del biofilm inicial con etanol [adición BHI con 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 % etanol (v/v)]. La línea punteada verde indica el límite por encima del cual se considera la formación de biofilm positiva. B) Población total de células viables (UFC/ml) tras 24 h incubación. Las líneas rayadas rojas indican el biofilm inicial (D.O._{600nm}=3,2) y la población total de células viables ($2,6 \times 10^8$ UFC/ml) antes de la adición de etanol.

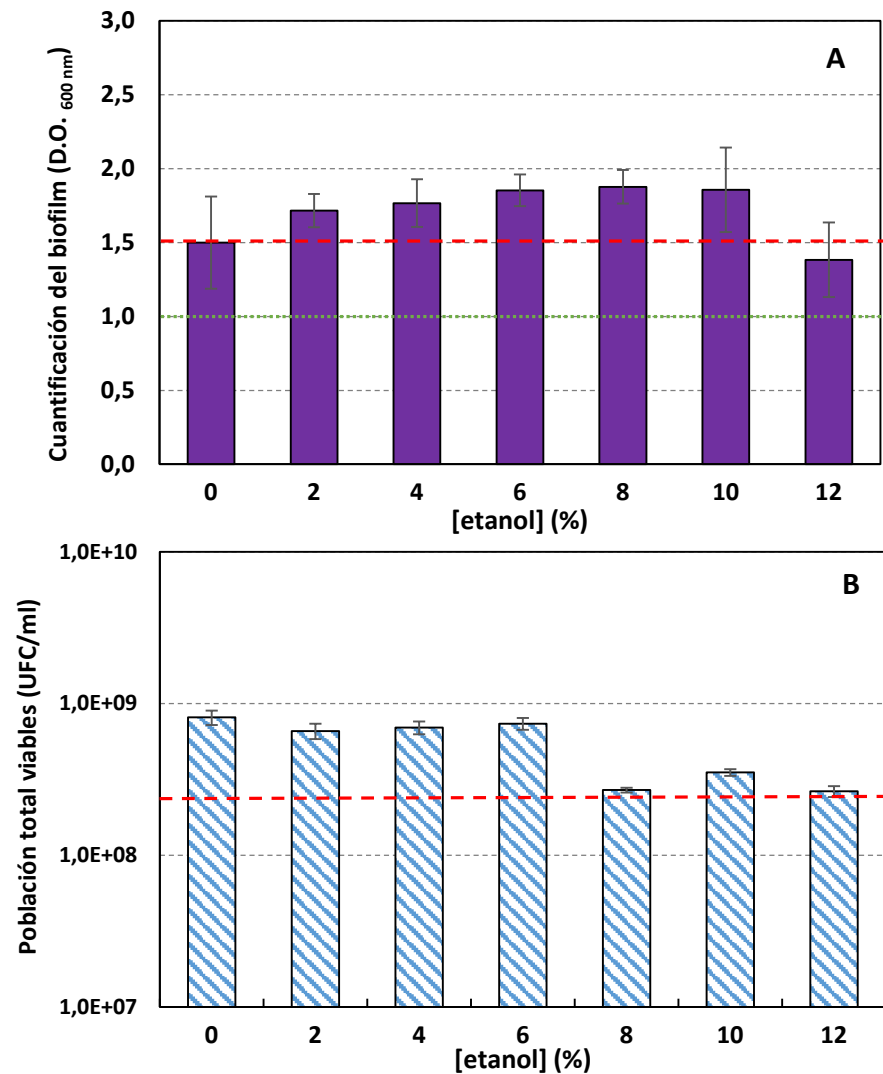


Figura III-32. A) Cuantificación del biofilm de la cepa *L. mesenteroides* J57 después de 24 h de incubación del biofilm inicial con etanol [adición BHI con 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 % etanol (v/v)]. La línea punteada verde indica el límite por encima del cual se considera la formación de biofilm positiva. B) Población total de células viables (UFC/ml) tras 24 h de incubación. Las líneas rayadas rojas indican el biofilm inicial (D.O._{600nm}=1,5) y la población total de células viables ($4,1 \times 10^8$ UFC/ml) antes de la adición de etanol.

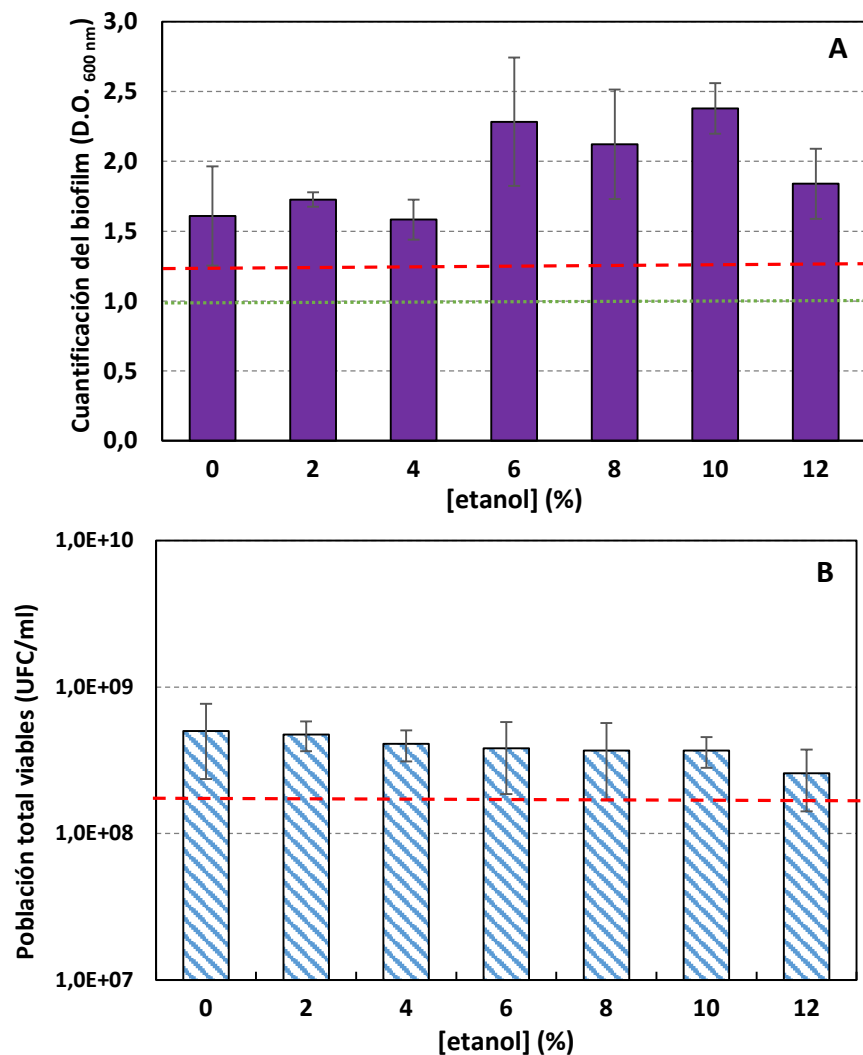


Figura III-33. A) Cuantificación del biofilm de la cepa *L. plantarum* J39 después de 24 h de incubación del biofilm inicial con etanol [adición BHI con 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 % etanol (v/v)]. La línea punteada verde indica el límite por encima del cual se considera la formación de biofilm positiva. B) Población total de células viables (UFC/ml) tras 24 h de incubación. Las líneas rayadas rojas indican el biofilm inicial (D.O._{600nm}=1,3) y la población total de células viables (3,2x10⁸ UFC/ml) antes de la adición de etanol.

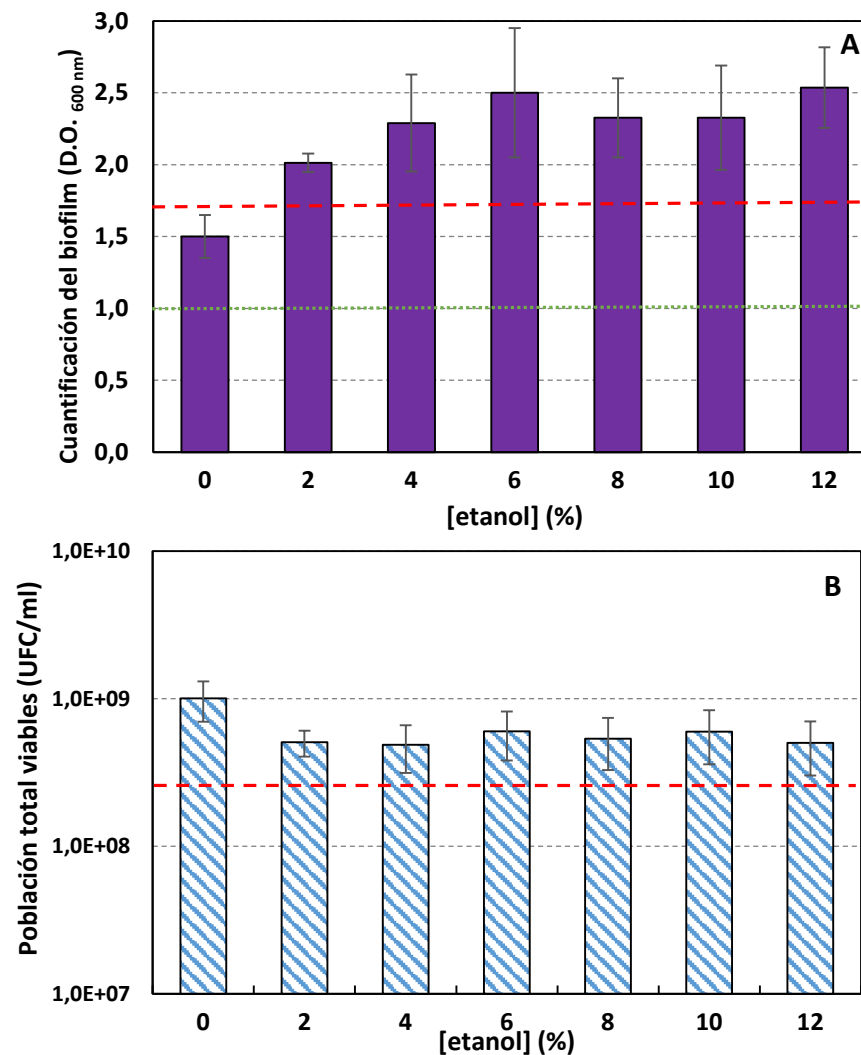


Figura III-34. A) Cuantificación del biofilm de la cepa *O. oeni* IS151 después de 24 h de incubación del biofilm inicial con etanol [adición BHI con 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 % etanol (v/v)]. La línea punteada verde indica el límite por encima del cual se considera la formación de biofilm positiva. B) Población total de células viables (UFC/ml) tras 24 h de incubación. Las líneas rayadas rojas indican el biofilm inicial (D.O._{600nm}=1,7) y la población total de células viables (3,9x10⁸ UFC/ml) antes de la adición de etanol.

Se observa que el biofilm de BL iba aumentando progresivamente a medida que era mayor la concentración de etanol añadido en el medio dentro del rango de 0 a 10 % etanol, y a concentraciones mayores de etanol ya el biofilm comenzaba a disminuir ligeramente, en el rango de 10 a 12 % para las BL ensayadas, menos para *O. oeni*, que con 12 % etanol continuó engrosando su biofilm (**Figura III-34 A**). En todos estos ensayos de adición de medio con etanol sobre un biofilm ya formado, la población de BL viables no disminuyó en ningún caso (**Figuras III-31 B, III-32 B, III-33 B y III-34 B**), incluida la concentración de 12 % etanol, e incluso la población bacteriana aumentó en presencia de 12 % etanol (**Figuras III-31 B, III-33 B y III-34 B**). Estos resultados indican que cuando las células bacterianas se encuentran formando un biofilm presentan una mucho mayor resistencia al agente antimicrobiano, el etanol en este caso, que cuando se encuentran en forma planctónica, y responden a él generando más biofilm, si bien, a concentraciones ya elevadas (≥ 10 % etanol en nuestros ensayos) el biofilm no continúa su engrosamiento y comienza a disminuir. En efecto, la matriz extracelular del EPS generado por la bacteria confiere al biofilm características de una cierta impermeabilidad a líquidos y gases, y hace que en el caso de biofilms de *B. subtilis* éste sea resistente incluso a una concentración del 80 % de etanol (Epstein *et al.*, 2011). La especie *O. oeni*, tal y como se señala en el apartado de Introducción, presenta la característica única de que todos los genomas estudiados presentan varios genes dedicados al metabolismo de EPS, indicando con ello que éste puede llevar a cabo un papel importante para su supervivencia y adaptación a medios hostiles, y muy especialmente de resistencia al etanol del medio vínico, su nicho ecológico natural.

Respecto a la especie *L. plantarum* también se ha descrito su mayor resistencia al etanol cuando se encuentra formando biofilms que en forma planctónica, resistiendo concentraciones de hasta 45 % etanol que en forma planctónica no es capaz de resistir (Kubota *et al.*, 2008 y 2009). Sin embargo, estos trabajos de Kubota y col. sobre la resistencia de los biofilms de *L. plantarum* no muestran efectos de activación de la formación de los biofilms o de disminución de los mismos por la presencia del etanol.

En relación a la especie *O. oeni*, existen pocos trabajos que estudien el efecto de la concentración de etanol sobre su producción de EPS, y en la bibliografía no se ha encontrado ninguno sobre el efecto del etanol sobre la formación de biofilms de esta especie. Un trabajo de Ibarburu *et al.*, (2007) sobre producción de EPS por una cepa *O. oeni* aislada de sidra mostró que 10 % etanol inhibía la producción de EPS y el crecimiento de esa cepa, y no observaban aumento en la producción del EPS al estudiar el rango de concentraciones de 2,5 a 8 % etanol.

Nuestros resultados muestran claramente para las cuatro BL el aumento de la capa del biofilm como respuesta a la adición de etanol sobre él, y esto se puede explicar siguiendo el

modelo para la formación del biofilm en bacterias Gram-positivas. En la bacteria modelo *B. subtilis* la surfactina, un lipopéptido con una potente actividad surfactante y antimicrobiana, es precisamente una de las moléculas que desencadena la cascada de señales que conducen directamente a la activación de la síntesis y formación del biofilm (Vlamakis *et al.*, 2013). La molécula de surfactina tiene la capacidad de insertarse en la membrana celular y provocar una salida de iones potasio, lo cual inmediatamente activa la histidina quinasa denominada KinC y comienza una cascada de señalización a través de fosforilaciones en la ruta denominada de Spo0A, un regulador transcripcional central, el primero que es fosforilado en un residuo de Asp específico y que controla la expresión de más de 100 genes, incluidos entre ellos todos los genes necesarios para la síntesis del EPS, la formación de la correspondiente matriz extracelular y la posterior esporulación de las células y maduración del biofilm de *B. subtilis* (Vlamakis *et al.*, 2013). De forma análoga se ha descrito para bacterias Gram-positivas la inducción a través de la KinC de la formación del biofilm por concentraciones subletales de diversos agentes antimicrobianos, como es el caso del fungicida nistatina, el antibiótico valinomicina o el dióxido de cloro (Vlamakis *et al.*, 2013; Shemesh *et al.*, 2010). En el caso de las bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (Redelman *et al.*, 2012) y *S. epidermidis* (Rachid *et al.*, 2000) también se ha descrito que el tratamiento con etanol y con concentraciones subinhibitorias de antibióticos puede estimular la formación del biofilm a través de la activación de genes del operón *icaADBC*, donde *icaA* codifica una proteína trans-membrana con actividad N-acetil-glucosaminil-transferasa y desencadena la cascada de señalización para la formación del biofilm en estas especies del género *Staphylococcus*.

En nuestro caso, el etanol, como agente antimicrobiano capaz de penetrar en la membrana plasmática de las bacterias de forma análoga a como lo hacen otros antimicrobianos, cuando se encuentra en concentraciones tolerables (subletales) para las células que están formando el biofilm, interaccionaría con ellas y desencadenaría la señal necesaria para que las BL activen su mecanismo de respuesta generando aún más biofilm y proliferando, tal y como muestran nuestros resultados, que por primera vez evidencian la activación de la formación del biofilm por concentraciones de etanol subletales para las células que constituyen un biofilm.

3. PRODUCCIÓN DE NISINA EN CONDICIONES ENOLÓGICAS

3.1. Estudio de la producción de nisina por la cepa *L. lactis* LM29

La cepa productora de nisina *L. lactis* LM29 había sido aislada y caracterizada por el grupo del Dr. Juan Miguel Rodríguez de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, como una buena BL productora de nisina (Martín *et al.*, 2003). Esta cepa se planteaba como una excelente BL para la obtención de un fermentado rico en nisina y con grado alimentario, dado el carácter QPS (qualified presumption of safety) y el origen de esta cepa. El objetivo que se planteó fue conseguir que ese preparado rico en nisina obtenido del cultivo de la cepa LM29 tuviera características enológicas que permitieran su potencial aplicación en la elaboración de vinos y para el control microbiológico de los mismos, evitando el crecimiento bacteriano dada su actividad inhibidora del crecimiento de BL y BA, lo cual permitiría además disminuir los niveles de sulfuroso que se utilizan en enología para el control microbiológico de los vinos.

a) En primer lugar se estudió el crecimiento y la producción de nisina de la cepa *L. lactis* LM29 en el medio MRS. El método utilizado es el descrito en el apartado 4.3. Materiales y Métodos. Este experimento se realizó por triplicado. La población inicial de la que se partió fue en torno a 10^7 UFC/ml. Se muestran en la **Figura III-35** los resultados del crecimiento, obtenidos por medidas tanto de absorbancia (línea discontinua) como UFC/ml (línea continua).

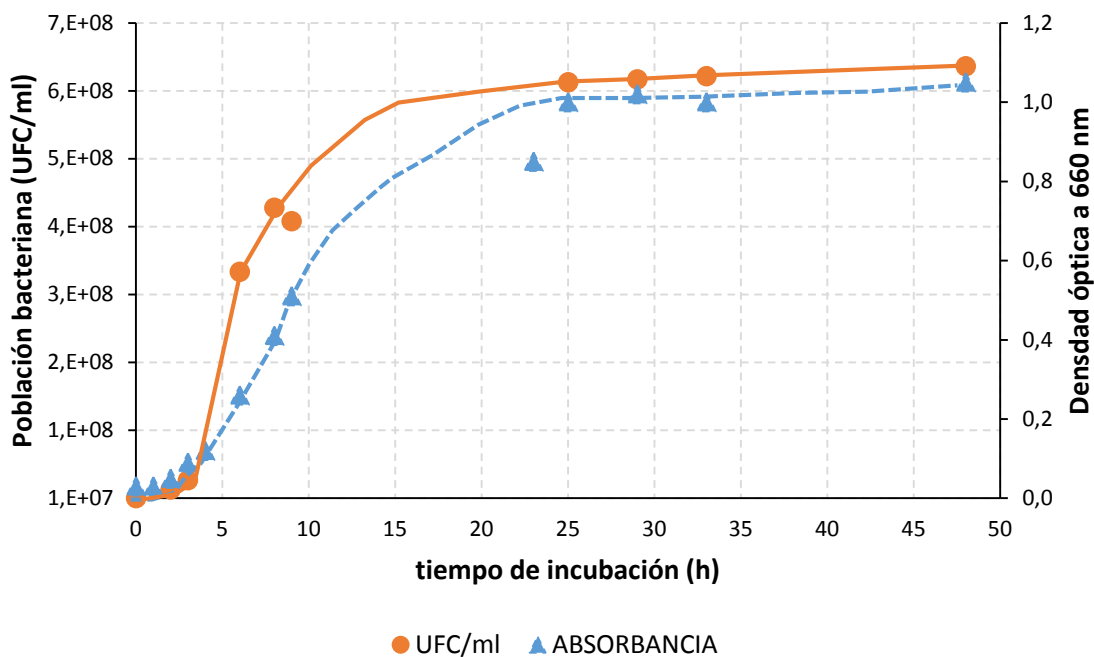


Figura III-35. Curva de crecimiento de la cepa *L. lactis* LM29 en el medio MRS.

En la **Figura III-35** se puede observar que las medidas tanto de absorbancia como de UFC/ml muestran la misma evolución del crecimiento, alcanzando la fase estacionaria de crecimiento a las 24 horas de incubación de *L. lactis* LM29. En diferentes puntos (3, 6, 8, 9, 25, 29, 33 y 48 horas) de esta curva de crecimiento se tomaron alícuotas del medio de cultivo para determinar la actividad bacteriocina de estos extractos libres de células, y los resultados obtenidos por las técnicas de microtiter (U.A.) y difusión en agar (representados los cm de diámetro del halo de inhibición del crecimiento de la cepa indicadora) se muestran en la **Figura III-36**.

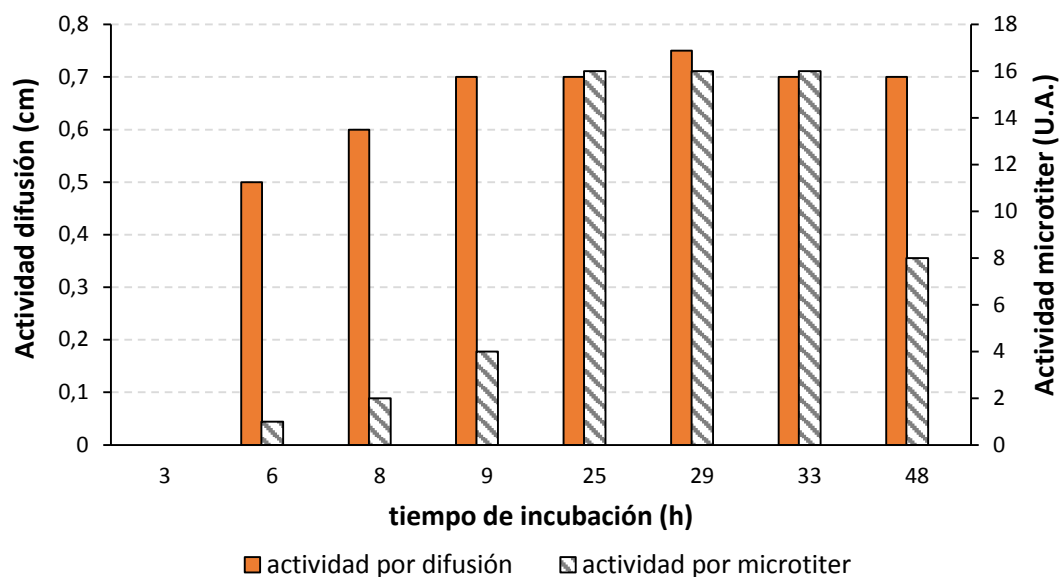


Figura III-36. Medidas de actividad bacteriocina de los extractos realizadas por las técnicas de difusión en agar (cm diámetro del halo de inhibición) y microtiter (UA).

Los resultados mostrados en la **Figura III-36** indican que no había actividad de la nisina en los extractos obtenidos a las 3 horas de incubación (correspondiente a la fase de latencia). Sin embargo entre las 6-25 horas la cantidad de nisina en el medio iba aumentando y se puede detectar por ambas técnicas de medición de la actividad de esta bacteriocina. A partir de las 24 horas (fase estacionaria) la concentración de nisina permanece estable en el medio hasta las 48 horas de incubación de la cepa *L. lactis* LM29, manteniendo niveles de 16 U.A. de actividad por 25 μ l de extracto (correspondiente en difusión a un halo de inhibición de la cepa indicadora C531 sensible a la nisina de 0,7 cm de diámetro). A la vista de los resultados se concluye que la cepa *L. lactis* LM29 es capaz de producir una cantidad considerable de nisina cuando crece en el medio MRS durante 24 horas.

b) Seguidamente se estudió la producción de nisina cultivando la bacteria LM29 en el medio MRS con diferentes concentraciones de mosto de uva blanca comercial para intentar asemejar las condiciones del medio a las enológicas, y para ello se utilizaron las siguientes concentraciones de mosto: 0, 20, 40, 60, 80 y 100 %, según se describe en el apartado 4.3.1. de Materiales y Métodos. Se estudió el crecimiento mediante medidas de absorbancia (datos no mostrados) y las medidas de UFC/ml se muestran en la **Figura III-37**, donde también se pueden observar los resultados obtenidos por la técnica microtiter (U.A.) para la actividad bacteriocina en el sobrenadante del cultivo libre de células.

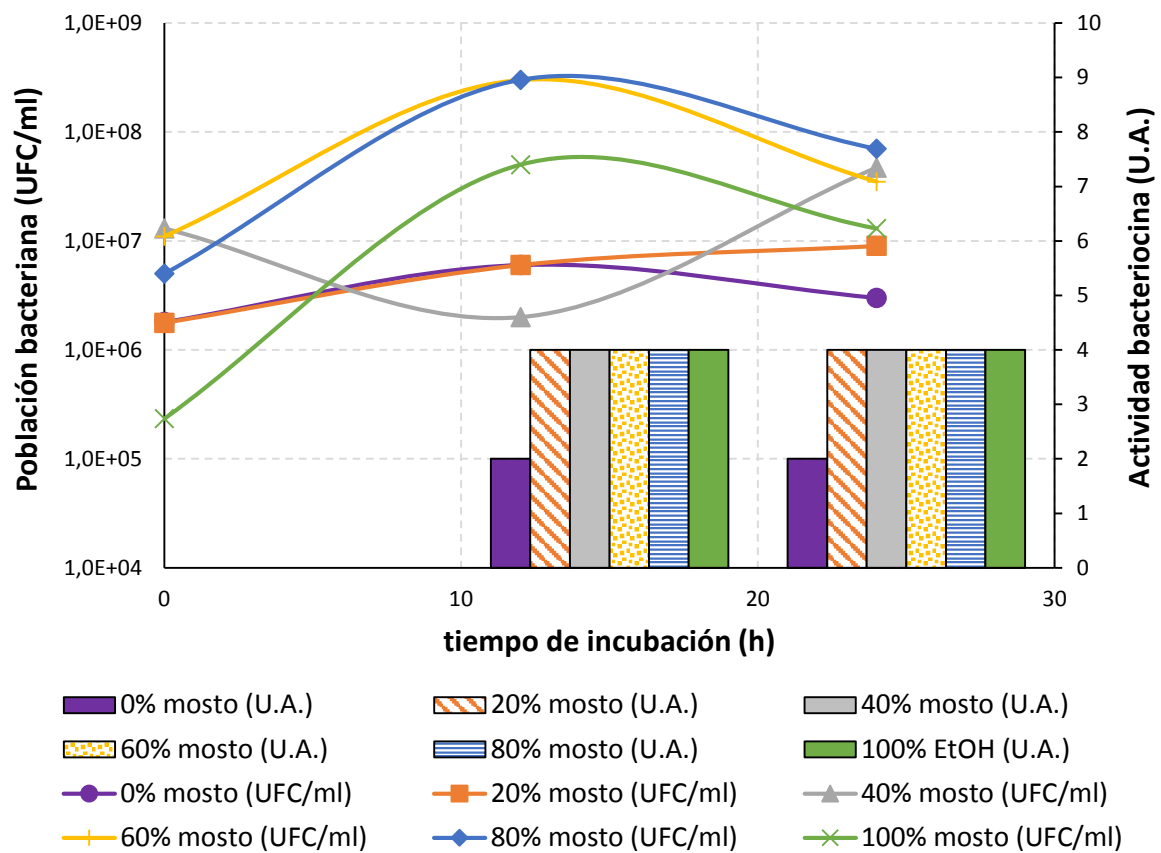


Figura III-37. Evolución de la población de bacterias viables (UFC/ml en líneas) y actividad bacteriocina determinada por microtiter (U.A. en barras) durante la incubación durante 24 h de *L. lactis* LM29 en el medio MRS con 0, 20, 40, 60, 80 y 100 % (v/v) de mosto.

En estos ensayos se partió de poblaciones altas de la bacteria productora que sólo aumentaron ligeramente, alcanzándose las mayores poblaciones cuando el medio se componía de MRS con 60 % y 80 % de mosto. Respecto a la actividad bacteriocina, se puede observar por la técnica microtiter que en un cultivo de 12 horas de *L. lactis* LM29 se detectaba una actividad de 4 U.A. en 25 µl del sobrenadante libre de células, presentando igual actividad en todos los casos en los que había mosto en el medio de cultivo, y siendo mayor que la actividad bacteriocina del

extracto del cultivo en sólo MRS. Por lo tanto la presencia de mosto parecía aumentar ligeramente la cantidad de nisina en el medio y la cepa crecía también de forma moderada. A la vista de estos resultados se escogió la concentración de mosto de 60 % como la más adecuada para los experimentos siguientes ya que en difusión (datos no mostrados) presentó el halo de inhibición más grande. Estos resultados coinciden con los descritos por [Diez y col. \(2012\)](#) que detectaron, en similares condiciones experimentales, que la producción de pediocina fue máxima con un 60 % de mosto en el medio.

3.2. Estudio del crecimiento y producción de nisina por *L. lactis* LM29 en MRS con etanol

En este ensayo la composición del medio además de MRS presentaba diferentes concentraciones de etanol (0, 2, 6, 8, 10 y 12 %). El ensayo se realizó a 20°C según se describe en el apartado 4.3.2.a) de Materiales y Métodos. En la **Figura III-38** se muestran los resultados de crecimiento (UFC/ml) y actividad bacteriocina (técnica microtiter) obtenidos en este ensayo.

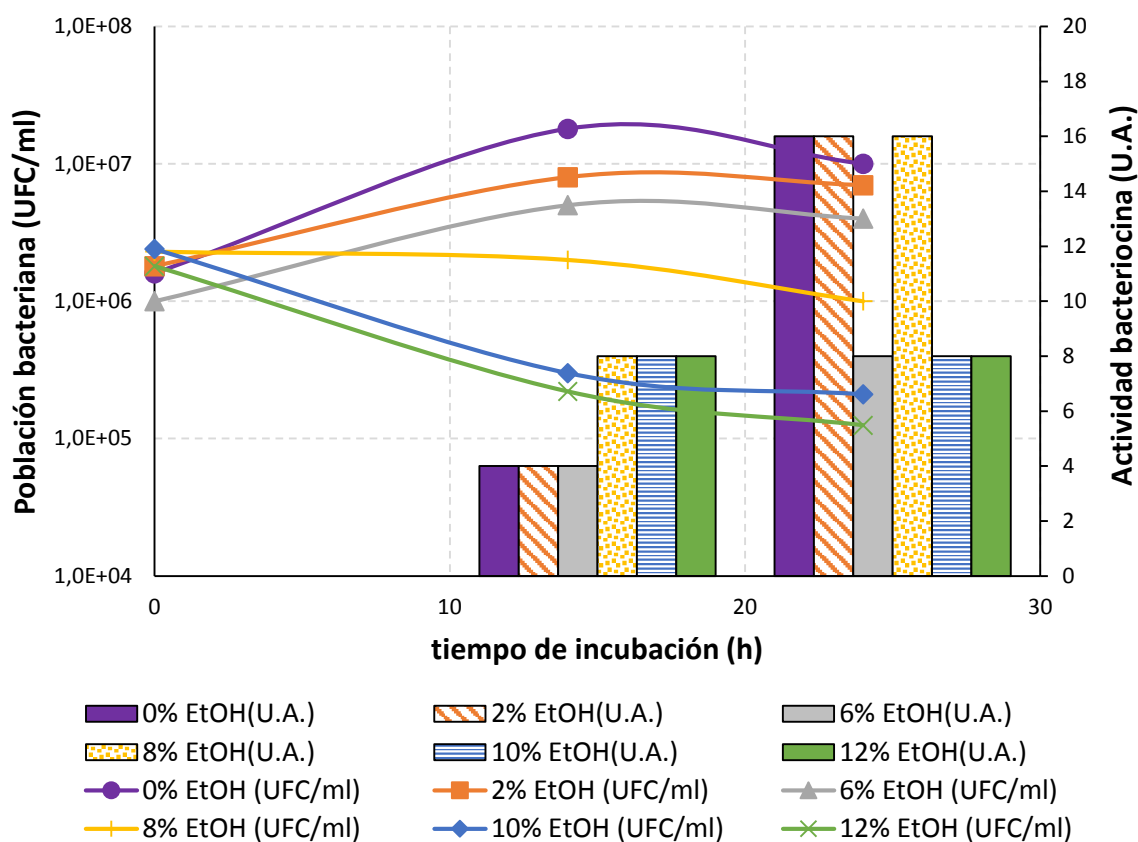


Figura III-38. Evolución de la población de bacterias (UFC/ml en líneas) y actividad bacteriocina medida por microtiter (U.A. en barras) durante 24h de incubación de *L. lactis* LM29 en medio MRS con 0, 2, 6, 8, 10 y 12 % (v/v) de etanol.

Se puede observar en la **Figura III-38** que partiendo de una población bacteriana alta (2×10^6 UFC/ml) *L. lactis* LM29 fue capaz de crecer con 2 y 6 % de etanol en el medio de manera similar a como crecía en MRS, sin embargo no hubo crecimiento con un 8 % de etanol en el medio y las células de LM29 morían en el cultivo con 10 y 12 % de etanol. Respecto a la actividad bacteriocina, se puede observar que a las 14 horas en todos los medios había actividad, más elevada en los medios con 8, 10 y 12 % de etanol. A las 24 horas la actividad bacteriocina era prácticamente similar en todos los extractos de los sobrenadantes libres de células. Este resultado parece indicar que el etanol ayuda a la liberación de nisina del interior de las células al medio, obteniendo extractos con un 8, 10 y 12 % de etanol con una actividad bacteriocina considerable (8-16 U.A.) a pesar de que la cepa no crecía en los medios con 8 % o más etanol.

A la vista de estos resultados en el siguiente experimento se partió de poblaciones menores para poder obtener cultivos en las diferentes fases de crecimiento de la cepa LM29 en estas condiciones y estudiar la producción de nisina con etanol en el medio. Las condiciones de este experimento se detallan en el apartado 4.3.2.b) y se realizó por triplicado. Para ello se partió de poblaciones alrededor de 10^4 UFC/ml, se ensayaron las concentraciones de etanol en el medio de 0, 2, 4, 8 y 12 % y se monitorizó el crecimiento celular mediante las mediciones de D.O._{660nm} y UFC/ml así como la actividad bacteriocina por las técnicas de difusión (datos no mostrados) y microtiter. Los resultados se muestran en la **Figura III-39** y fueron contrastados con los datos obtenidos para la medida del crecimiento mediante D.O._{660nm} y la actividad bacteriocina mediante la técnica de difusión en agar (datos no mostrados), obteniéndose idénticos resultados.

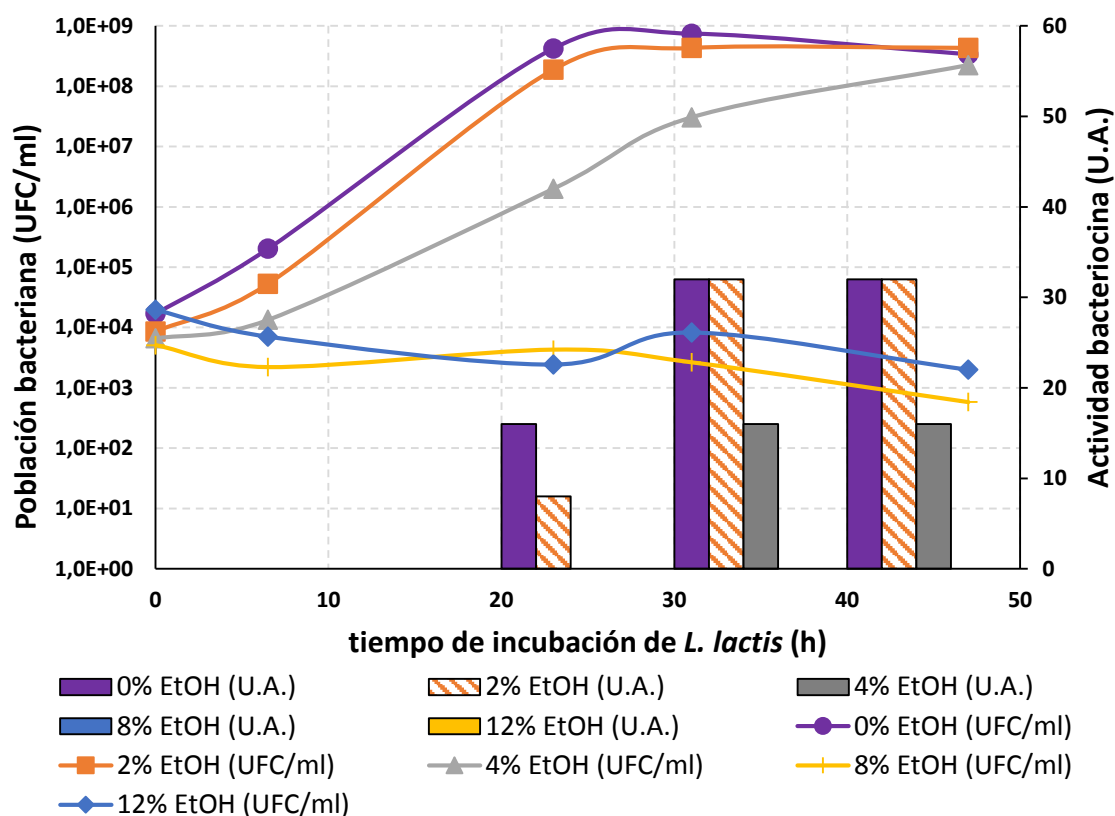


Figura III-39. Evolución de la población de bacterias (UFC/ml en líneas) y actividad bacteriocina medida por microtiter (U.A. en barras) durante 48 h de incubación de la cepa *L. lactis* LM29 en MRS con 0, 2, 4, 8 y 12 % (v/v) de etanol.

Se puede apreciar en la **Figura III-39** que el crecimiento de la cepa *L. lactis* LM29 más rápido se obtiene cuando no hay etanol en el medio y cuando hay un 2 %, llegando a alcanzar en ambos casos poblaciones similares. Cuando el medio MRS contiene un 4 % de etanol, el crecimiento se ralentiza, pero finalmente alcanza a las 48 horas poblaciones similares a las obtenidas en ausencia de etanol. En el caso de existir un 8 y 10 % de etanol en el medio, la cepa ya no crece y su población va disminuyendo.

Respecto a la actividad bacteriocina de los extractos, en la **Figura III-39** se observa que durante las primeras 6,5 horas de incubación no se pudo detectar actividad de la nisina en el medio. Sin embargo a las 23 horas pudimos detectar la actividad nisina en los extractos obtenidos de los cultivos en MRS y MRS con etanol 2 %, donde se había producido un aumento de la población bacteriana. Finalmente, se pudo detectar actividad de la nisina en los extractos de los sobrenadantes del cultivo en MRS con etanol 4 % a las 31 horas y 47 horas de incubación. Por lo tanto, vemos que *L. lactis* LM29 creció y produjo nisina en los cultivos en los medios MRS y MRS

con 2 % y 4 % etanol, siendo el crecimiento en MRS con 4 % más lento, pero alcanzando finalmente el mismo nivel poblacional. La actividad de la nisina alcanzada en los medios MRS y MRS con 2 % etanol llegó a 32 U.A. y en MRS con 4 % etanol fue ligeramente menor (16 U.A.). Esta actividad permaneció estable en el medio durante las 47 horas que se mantuvo la incubación.

Por lo tanto, estos resultados indicaban que la cepa LM29 no era capaz de crecer ni producir nisina en un medio con 8 y 12 % etanol y que era capaz de crecer y producir nisina en el medio MRS con hasta un 4 % de etanol (**Figuras III-39**). De manera similar, el estudio de [Diez y col. \(2012\)](#) sobre la producción de pediocina también detectaron una producción de bacteriocina con hasta un 4 % de etanol en el medio. Por otro lado, cuando en el medio con un contenido de etanol entre 8 y 12 % se incubaban poblaciones de bacterias más altas (10^6 UFC/ml) LM29 no era capaz de sobrevivir pero se detectaba actividad nisina en los extractos de los sobrenadantes de los cultivos (**Figura III-38**) muy posiblemente por la liberación al medio de la nisina del interior de la células muertas por efecto del etanol.

3.3. Estudio del crecimiento y producción de nisina por *L. lactis* LM29 en MRS con mosto y etanol

Se estudió el crecimiento y la actividad bacteriocina de diferentes extractos obtenidos del cultivo de la cepa LM29 en medios que contenían combinaciones de mosto y etanol. Se probaron las siguientes combinaciones: MRS con 60 % mosto, y las concentraciones de etanol: 0, 8 y 12 % (v/v), además del control con MRS según se describe en el apartado 4.3.3. de Materiales y Métodos.

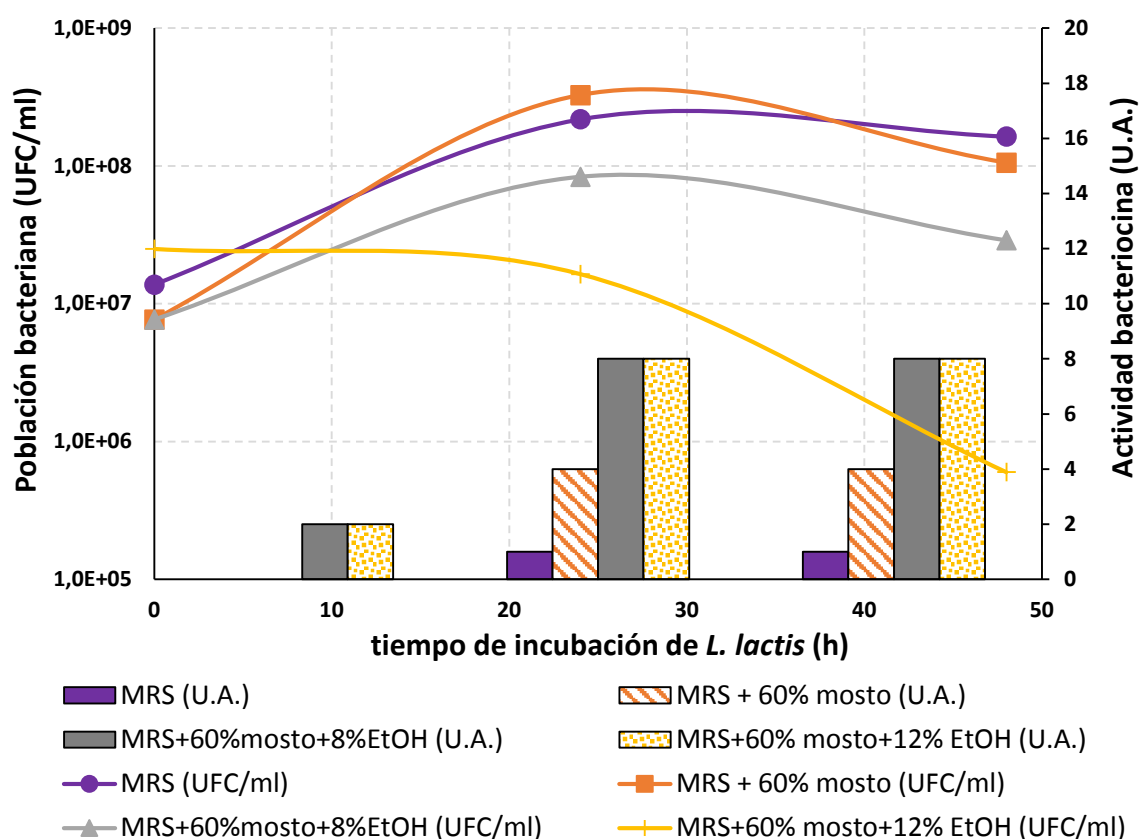


Figura III-40. Evolución de la población de bacterias (UFC/ml en líneas) y actividad bacteriocina medida por microtiter (U.A. en barras) durante las 48 h de incubación de la cepa *L. lactis* LM29 en MRS, MRS + 60 % mosto, MRS + 60 % mosto + 8 % etanol y MRS + 60 % mosto + 12 % etanol.

En la **Figura III-40** se muestra la actividad bacteriocina y se puede observar que en las primeras horas sólo existe nisina en los extractos de los cultivos que tienen etanol (8 y 12 %), los cuales no presentaban crecimiento, por lo cual la nisina provendrá de la liberación al medio por el efecto del etanol sobre las células del inóculo. Sin embargo a las 24 horas aparece nisina también en los extractos de los cultivos con MRS y MRS + 60 % mosto, en este caso sí hubo crecimiento por lo que la nisina presente en el medio provendrá de la producción por parte de la cepa LM29. La concentración de nisina permanece estable hasta las 48 h. Idénticos resultados se observaron con las mediciones de crecimiento mediante $D.O_{660nm}$ y de actividad bacteriocina mediante difusión en agar (datos no mostrados).

Estos resultados volvían a indicar que la nisina presente en los extractos de los sobrenadantes después de las incubaciones en el medio con etanol podía provenir de la liberación de la nisina de las células muertas al medio de cultivo, muy posiblemente debido al efecto del etanol. El etanol es un potente agente antimicrobiano, ejerce un efecto sobre los lípidos que forman las membranas biológicas alterando su fluidez, aumentando la permeabilidad de la

membrana, sobre las proteínas y puede provocar la deshidratación a nivel de membrana. Estos efectos producen la rotura de la membrana (Lonvaud-Funel 1999) y por tanto la liberación al medio de los componentes celulares, entre ellos la nisina generada, aumentando la concentración de ésta en el medio de cultivo.

3.4. Obtención de un extracto activo de nisina con características enológicas a partir de un cultivo de *L. lactis* LM29

A la vista de los resultados anteriores, realizamos el cultivo de la cepa *L. lactis* LM29 en el medio MRS, cuyo pH se ajustó al pH ácido del vino (3,5), que contenía 60 % mosto de uva blanca, 28 % agua y 12 % etanol. Se partió de un inóculo con una alta población de esta cepa (10^7 - 10^9 UFC/ml), se mantuvo la incubación durante 24 horas sin agitación y se obtuvo un volumen de 45 ml del sobrenadante libre de células según se describe en el apartado 4.3.4. de Materiales y Métodos.

La media de los valores obtenidos en el análisis de las muestras tomadas a tiempo cero y a las 24 horas se muestran en la **Tabla III-8**, donde se observa que, como en los experimentos anteriores, la bacteria LM29 no aumentó su población durante la incubación en el medio y el extracto obtenido del sobrenadante libre de células presentaba actividad de la nisina a las 24 horas de incubación, midiéndose por microtiter y resultando ser de 64 U.A./25 μ l frente la cepa indicadora C531 sensible a la nisina. En la **Figura III-41** se muestra la potente actividad inhibidora del crecimiento en el ensayo de difusión, donde el halo de inhibición generado por el extracto obtenido alcanzó un diámetro de 2 cm. Este extracto activo, además de la actividad de la nisina, presentaba una composición que se podía asemejar a la de un mosto en fermentación: azúcares y componentes del mosto de uva blanca (60 % v/v), etanol residual (evaporación durante el procesamiento del extracto a 100°C para la obtención del sobrenadante libre de células) y las sales, vitaminas y compuestos nitrogenados del medio MRS con un pH de 3,5.

Tabla III-8. Resultados de población de bacterias viables y actividad obtenidos durante la obtención del extracto activo en condiciones enológicas.

UFC/ml t=0	UFC/ml t=24h	Actividad bacteriocina* t=0	Actividad bacteriocina* t=16h	Actividad bacteriocina* t=24h
$7,3 \times 10^8 \pm 3,1 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7 \pm 5,1 \times 10^6$	8	16	64

*Unidades de actividad bacteriocina: U.A./25 μ l de extracto (según ensayo microtiter indicado apartado 4.2.1).

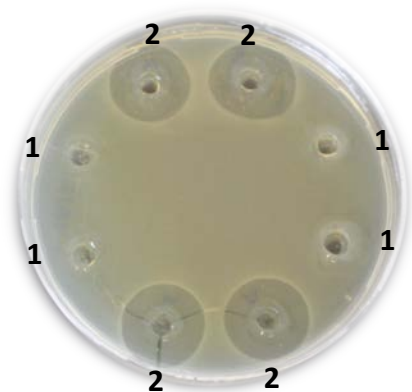


Figura III-41. Foto donde se muestran los resultados obtenidos por la técnica de difusión en agar de la inhibición de la cepa C531 por el extracto. Se pueden apreciar los halos de inhibición del crecimiento de la cepa indicadora *P. pentosaceus* C531 (halos de 2 cm de diámetro). (1 es el control negativo sin inocular con LM29; 2 es el extracto obtenido en este ensayo por incubación de LM29 en MRS + 60% mosto + 12% etanol).

Tabla III-9. Composición del extracto activo obtenido con nisina (pH=3,5).

COMPONENTE	Cantidad en 45 ml de extracto activo
Extractos proteicos del medio MRS (peptona, extracto de levadura, aminoácidos...)	0,99 g
Azúcares (glucosa y otros azúcares del mosto de uva)	5,44 g
Polisorbato 80 (tween 80)	0,045 ml
K ₂ HPO ₄	0,09 g
NaCH ₃ CO ₂ x 3H ₂ O	0,225 g
Citrato de amonio ((NH ₄) ₂ HC ₆ H ₅ O ₇)	0,10 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,009 g
MnSO ₄ x 4H ₂ O	0,00225 g
etanol residual	-
Otros componentes minoritarios del zumo de uva blanca y metabolitos de <i>L. lactis</i> LM29	

En el siguiente apartado 3.5. se muestra la actividad este extracto obtenido del cultivo de *L. lactis* LM29 frente a diferentes bacterias de origen enológico.

3.5. Determinación de la actividad bacteriocina del extracto de nisina obtenido en condiciones enológicas frente a bacterias de origen enológico

El extracto de nisina obtenido se ensayó frente a la colección de bacterias indicadas en la **Tabla II-4** (apartado 4.1. de Materiales y Métodos). Los resultados de inhibición del crecimiento de las diferentes cepas de BL y BA de origen enológico ensayadas se muestran en las **Figura III-42** (*O. oeni*), **III-43** (otras BL distintas de *O. oeni*) y **III-44** (bacterias acéticas). En estas figuras se representa el número de cepas inhibidas (eje de ordenadas) frente a la máxima dilución del extracto (U.A.) que inhibe el crecimiento de cada una de las bacterias en el ensayo de microtiter. El número 0 significa que el crecimiento de la bacteria enológica ensayada no se inhibe por el

extracto, 1 indica que el crecimiento de la bacteria se inhibe por los 50 μ l del extracto sin dilución, y los números 2 al 2056 son las diluciones dobles seriadas del extracto activo. Cuanto más a la derecha del eje de abscisas se encuentre un histograma, significa que las BL incluidas en él son más sensibles al extracto. Cabe señalar aquí que se utilizó para cada en el ensayo microtiter el control negativo del medio sin inocular con *L. lactis* LM29, no obteniéndose inhibición en ninguno de los casos, comprobándose con ello que el control negativo sin nisina no inhibía el crecimiento de las bacterias ensayadas.

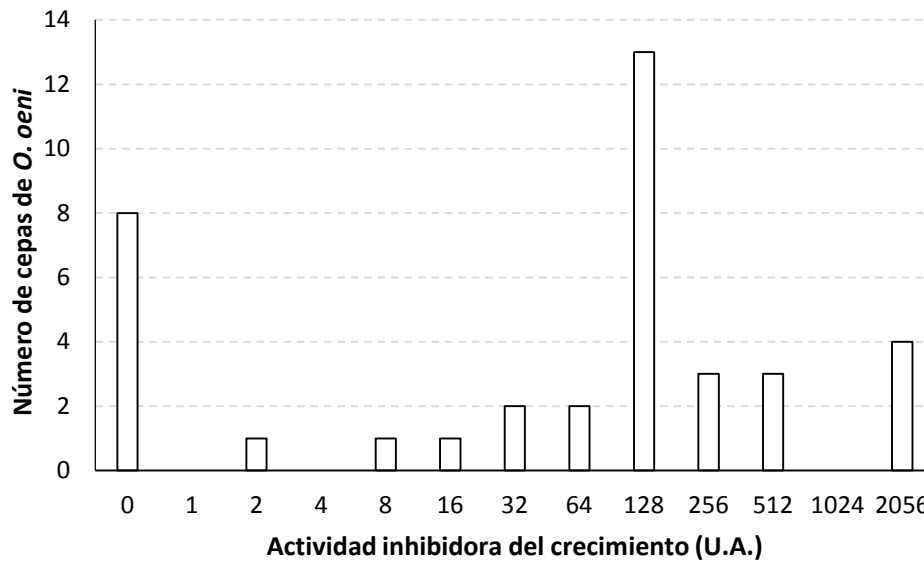


Figura III-42. Se representa el número de cepas de *O. oeni* (total de cepas ensayadas: 38) frente al factor de dilución máximo (U.A.) del extracto con el que se inhibe su crecimiento en el ensayo microtiter.

La **Figura III-42** muestra que 8 cepas de *O. oeni* no se inhibieron con el extracto (U.A.=0) (21 % del total de cepas *O. oeni*), mientras que el resto de las cepas (79%) fueron sensibles al extracto. Una dilución 1/128 del extracto inhibió a la mitad de las cepas de *O. oeni* ensayadas.

Las 8 cepas de *O. oeni* resistentes al extracto se aislaron tanto en plena como al final de la FML en diferentes bodegas de la D.O.Ca. Rioja. Estas cepas resistentes podrían ser excelentes candidatas a ser cultivos iniciadores para realizar la FML. El uso del extracto obtenido en este estudio podría ayudar a su implantación ya que inhibiría el crecimiento del resto de cepas de *O. oeni* (además de otras BL perjudiciales como se muestra a continuación) excepto la iniciadora que sería seleccionada entre las resistentes. Ya se realizó un estudio en este sentido 1991 por [Daeschel y col.](#), los cuales utilizaron la nisina (100 U/ml) para controlar la FML y obtener cepas resistentes de *O. oeni* que a su vez fueron utilizadas para ser inoculadas junto con la nisina para realizar nuevas FML. Además de observar que las bacterias endógenas no fueron capaces de crecer hasta 5 meses después, observaron que la nisina permanecía estable en el vino.

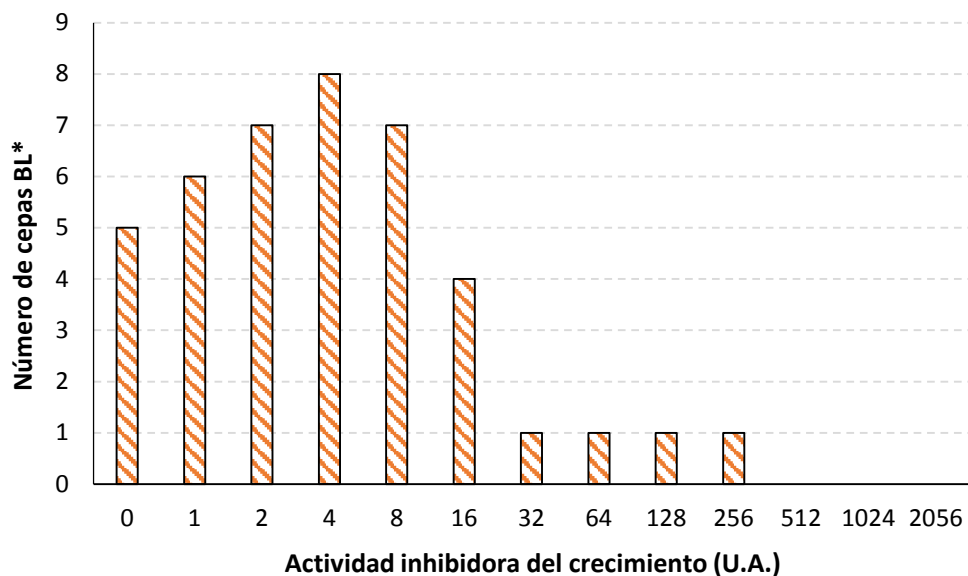


Figura III-43. Se representa el número de cepas de bacterias lácticas excepto *O. oeni* (total de cepas ensayadas: 41) frente al factor de dilución máximo (U.A.) del extracto con el que se inhiben en el ensayo microtiter.

En la **Figura III-43** se puede ver que para el resto de BL ensayadas (BL excepto *O. oeni*), sólo 5 de las 41 cepas no fueron inhibidas por el extracto (12,2 %), las cuales pertenecían a las especies *L. plantarum* y *L. paracasei*. La mayoría de las cepas (36 de las 41 cepas, el 88 %) fueron inhibidas por el extracto. Una dilución 1/4 del extracto inhibió a la mitad de las BL ensayadas.

Por lo tanto el uso del extracto permitiría inhibir al 83,5 % de todas las cepas de BL incluida *O. oeni*, entre las cuales se encuentran especies que no interesa que proliferen en el vino ya que pueden influir negativamente en su calidad.

Comparando los resultados de las **Figuras III-42** y **III-43**, se puede concluir que con excepción de los 8 *O. oeni* resistentes, las cepas de *O. oeni* fueron las BL más sensibles a la nisina, lo cual está en concordancia con resultados previos publicados por el grupo de investigación (Rojo-Bezares *et al.*, 2007) que indicaban una CMI₅₀ de la nisina de 0,024 mg/l para la especie *O. oeni*, y una mayor resistencia de las otras BL a la nisina, cuya CMI₅₀ era 12,5 mg/l.

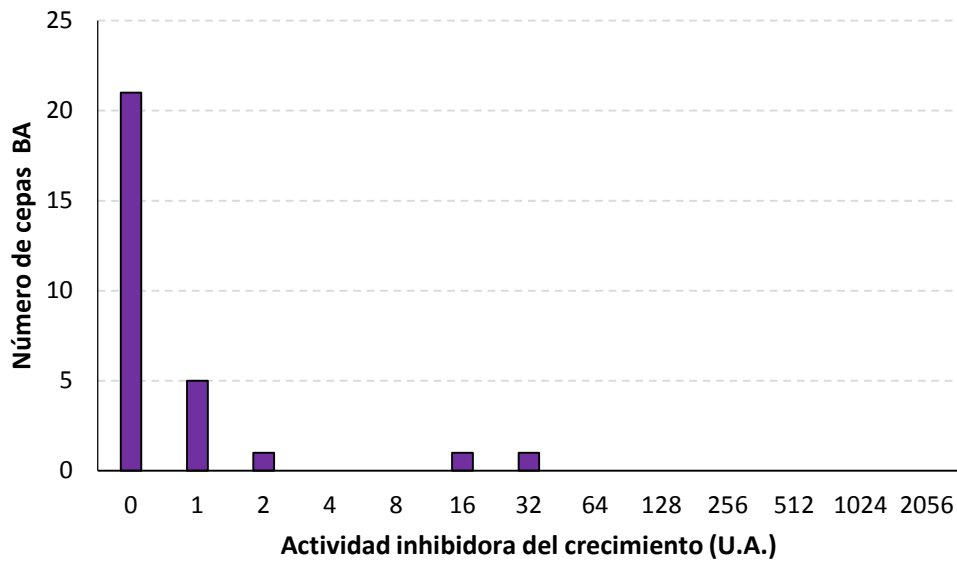


Figura III-44. Se representa el número de cepas de bacterias acéticas (total de cepas ensayadas: 29) frente al factor de dilución máximo (U.A.) del extracto con el que se inhiben en el ensayo microtiter.

Por comparación de los valores de actividad antimicrobiana del extracto y del patrón empleado de nisina comercial de concentración conocida (apartado 4.3.4 de Materiales y Métodos) se determinó la concentración equivalente de nisina en el extracto activo, resultando ser de 200 $\mu\text{g/ml}$. Por lo tanto, se consiguió un preparado con una eficaz concentración de nisina a partir de la BL *L. lactis* LM29 productora de esta bacteriocina.

Respecto a las bacterias acéticas, podemos ver en la **Figura III-44** que 21 de las 29 cepas de BA ensayadas (un 72 %) no vieron inhibido su crecimiento por la presencia del extracto. Cabe destacar que 7 de las 9 cepas de BA estudiadas aisladas del vinagre están entre las 21 cepas de BA resistentes al extracto, luego las bacterias aisladas del vinagre presentan alta resistencia a la nisina. Por lo tanto, estas fueron las bacterias más resistentes a la acción antimicrobiana del extracto, resultado que también se encuentra de acuerdo con los previamente publicados por el grupo de investigación (Rojo-Bezares *et al.*, 2007) para la inhibición de BA mediante el uso de nisina comercial, que presentaba una CMI_{50} de 200 mg/l para BA de origen enológico. Las BA también se han descrito como bacterias Gram negativas resistentes a otra bacteriocina, la pediocina PA-1, tanto en ausencia como en presencia de etanol en el medio (Diez *et al.*, 2012).

A la vista de los resultados, se puede concluir que la sensibilidad al extracto sigue el siguiente orden: *O. oeni* > otras BL > BA, es decir: las bacterias Gram negativas son más resistentes a la nisina que las Gram positivas, y dentro de estas últimas, *O. oeni* es la menos resistente. Estos resultados están de acuerdo con el trabajo previo publicado por el grupo de investigación (Rojo-

Bezares *et al.*, 2007) que ponía de manifiesto la actividad antimicrobiana de la nisina frente a las BL y BA del vino y su efecto antimicrobiano combinado con el metabisulfito empleado en enología, así como con otros estudios publicados en la bibliografía que coinciden en señalar a la nisina como un agente antimicrobiano con un amplio espectro de acción frente a bacterias Gram positivas (Sahl *et al.*, 1995) y que presenta menor actividad frente a bacterias Gram-negativas. La mayor resistencia de estas bacterias Gram-negativas se atribuye al efecto protector de la pared externa de peptidoglicano característica suya, la cual protege la membrana citoplasmática y la integridad de estas bacterias.

El uso de nisina está autorizado como aditivo y conservante en productos lácteos, carne, pescado y bebidas alcohólicas (Delves-Broughton *et al.*, 1996), pero todavía no ha sido aprobado su uso en vino. Sería interesante utilizar nuestro extracto en vinos tanto para evitar alteraciones bacterianas, como para ayudar a la implantación de un cultivo iniciador de la FML constituido por una cepa seleccionada de *O. oeni* entre las resistentes a la nisina. El empleo de nisina podría contribuir a disminuir las dosis de sulfuroso en el vino ya que la nisina potencia el efecto del metabisulfito presente en el vino (Rojo-Bezares *et al.*, 2007). En la bibliografía se ha descrito que el uso de la nisina no presenta efecto sobre las características sensoriales del vino (Radler 1990) y además es inocua para el organismo ya que las enzimas proteolíticas gastrointestinales la degradan.

4. EFECTO DE LA NISINA SOBRE BIOFILMS DE BACTERIAS ENOLÓGICAS

4.1. Efecto de la nisina sobre bacterias lácticas enológicas formadoras de biofilm

A la vista de todos los resultados anteriores, se propuso investigar el efecto de la nisina sobre la capacidad de formar biofilms de las BL enológicas, intentando buscar desde el punto de vista de la elaboración de los vinos condiciones adecuadas para evitar la formación de biofilms no deseados de bacterias en el entorno enológico. En primer lugar se calculó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de la nisina frente al crecimiento de las células planctónicas de las cuatro BL enológicas formadoras de biofilm caracterizadas en el apartado 2.2 anterior (*L. mesenteroides* J32 y J57, *L. plantarum* J39 y *O. oeni* IS151). Posteriormente se realizaron los ensayos de formación de biofilm de estas cuatro BL utilizando nisina en una concentración subinhibitoria y con distintas concentraciones de etanol en el medio, y se repitieron los ensayos con una concentración alta de nisina, inhibitoria del crecimiento de las bacterias. Para estos ensayos ya se empleó la nisina comercial (Sigma-Aldrich, de *Streptococcus lactis*) con una pureza y una concentración bien conocidas.

En la **Tabla III-10** se muestran los resultados de los valores de CMI frente a las BL J32, J57, J39 e IS151 en estado planctónico, de la nisina y de los antimicrobianos enológicos: metabisulfito y etanol, según se describe en el apartado 3.5.a de Materiales y Métodos. Se eligió la concentración de nisina de 6 µg/ml para los ensayos posteriores porque este valor corresponde a una concentración subinhibitoria para las cuatro BL estudiadas, y la concentración 200 µg/ml se eligió como concentración inhibitoria del crecimiento y por ser la concentración que de forma natural había sido producida por la cepa *L. lactis* LM29.

Tabla III-10. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de MBS (metabisulfito), EtOH (etanol) y nisina de las BL formadoras de biofilm.

	CMI MBS (µg/ml)	CMI EtOH (%)	CMI nisina (µg/ml)
J32 (<i>Le. mesenteroides</i>)	150	15	287,5
J57 (<i>Le. mesenteroides</i>)	150	15	287,5
J39 (<i>Lb. plantarum</i>)	150	15	287,5
IS151 (<i>O. oeni</i>)	75	15	25

Según los resultados mostrados en la **Tabla III-10**, para las cepas *L. mesenteroides* J32 y J57 y para *L. plantarum* J39 se obtuvieron los mismos valores de CMI de los tres antimicrobianos. Sin embargo *O. oeni* IS151 era más sensible y presentaba CMIs de MBS y nisina más bajas.

4.2. Efecto de la nisina en concentración subinhibitoria sobre la formación de biofilms de bacterias lácticas enológicas

a) Bacterias inicialmente en estado planctónico

En el siguiente ensayo las cepas en forma planctónica se incubaron durante 48 horas en medio BHI con etanol (0, 2, 4, 6 y 8 %) sin nisina y con 6 µg/ml de nisina según se describe en el apartado 3.6. de Materiales y Métodos. En las **Figuras III-45, 46, 47 y 48** se muestran los resultados de la cuantificación del biofilm formado y de la correspondiente población total de células viables al cabo de las 48 horas de dicha incubación.

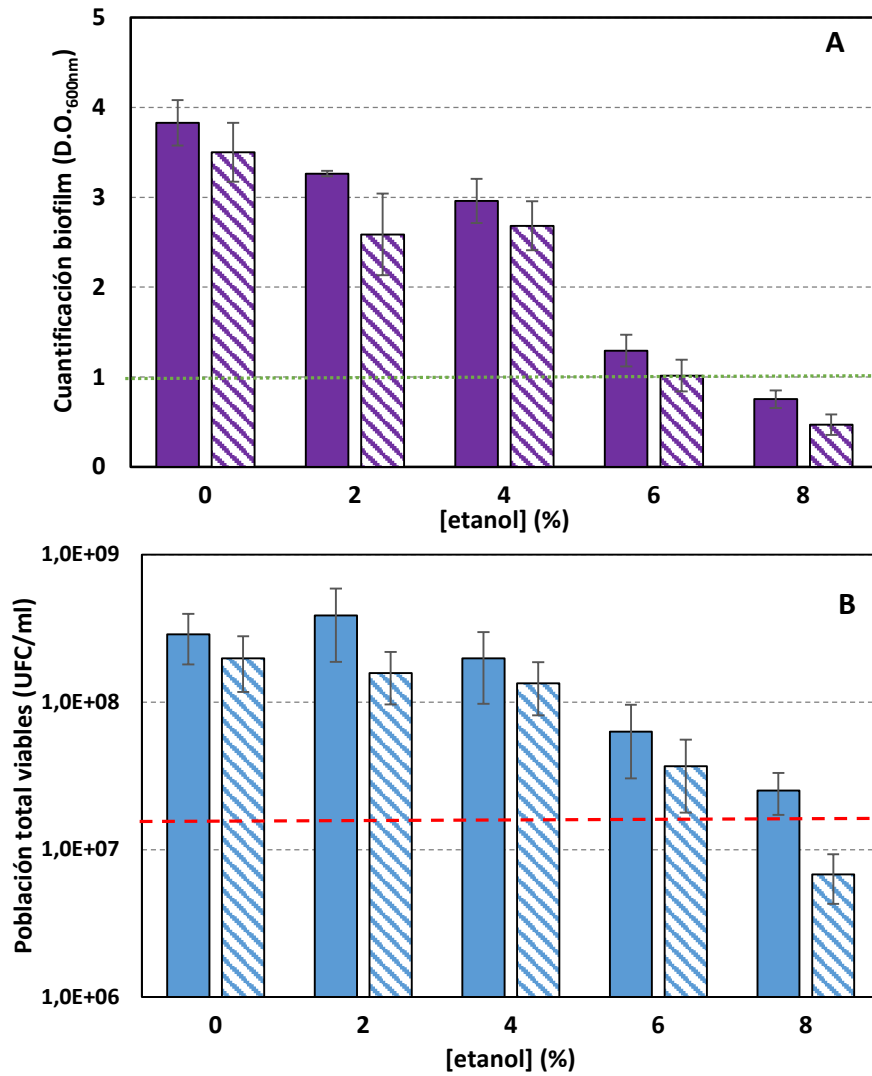


Figura III-45. A) Cuantificación del biofilm de la cepa *L. mesenteroides* J32 formado durante 48 h de incubación en el medio líquido BHI con etanol (0, 2, 4, 6 y 8 % (v/v) y nisina (■ 0 y ▨ 6 µg/ml). La línea punteada verde indica el límite por encima del cual se considera la formación de biofilm positiva. B) Población total de células viables (UFC/ml) en los medios con BHI con etanol (0, 2, 4, 6 y 8 %) y con ■ 0 y ▨ 6 µg/ml de nisina. La línea roja rayada indica la población inicial de células ($1,7 \times 10^7$ UFC/ml).

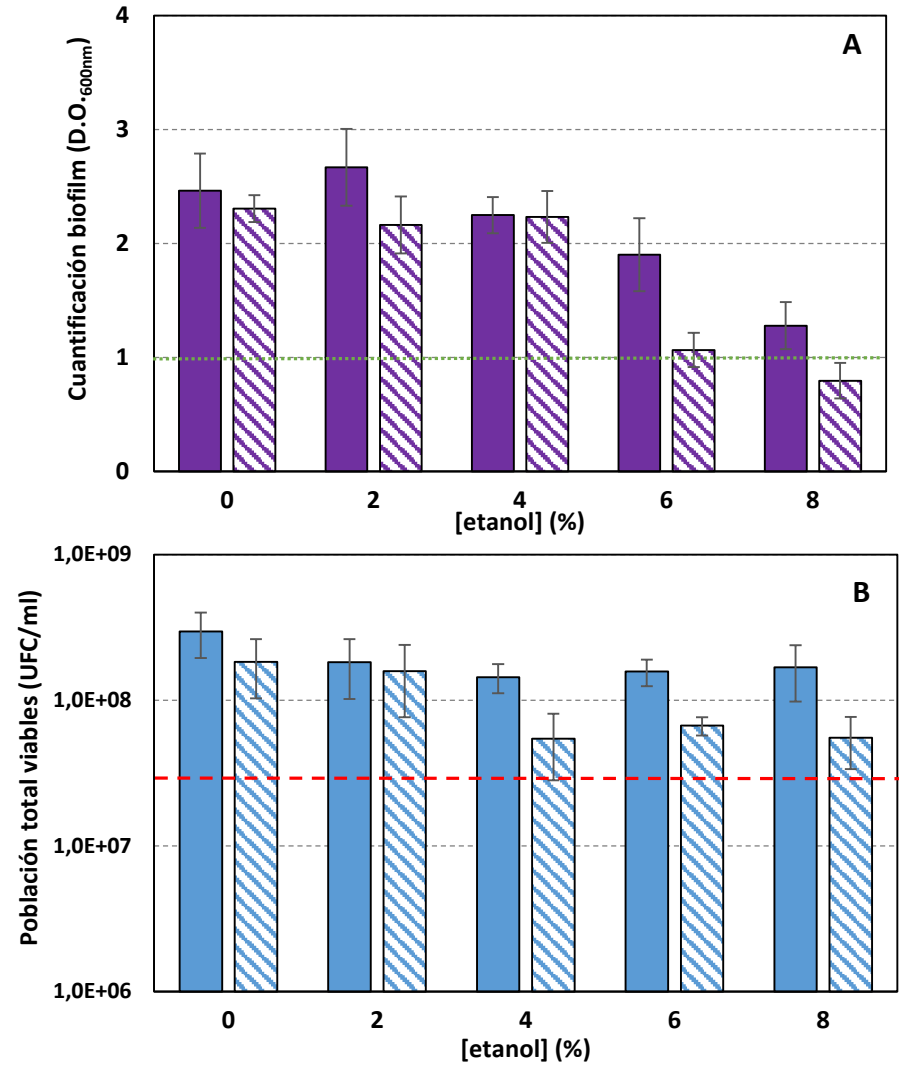


Figura III-46. A) Cuantificación del biofilm de la cepa *L. mesenteroides* J57 formado durante 48 h de incubación en el medio líquido BHI con etanol (0, 2, 4, 6 y 8 % (v/v) y nisina (■ 0 y ▨ 6 µg/ml). La línea punteada verde indica el límite por encima del cual se considera la formación de biofilm positiva. B) Población total de células viables (UFC/ml) en los medios con BHI con etanol (0, 2, 4, 6 y 8 %) y con ■ 0 y ▨ 6 µg/ml de nisina. La línea roja rayada indica la población inicial de células ($4,5 \times 10^7$ UFC/ml).

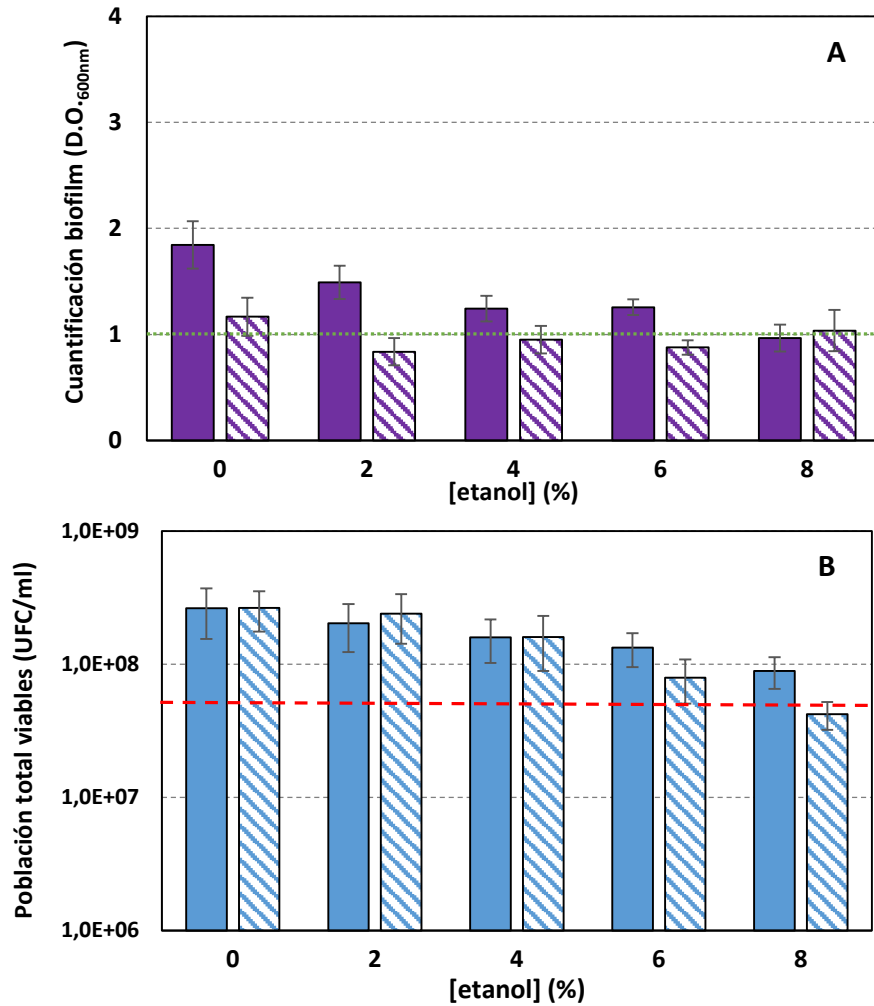


Figura III-47. A) Cuantificación del biofilm de la cepa *L. plantarum* J39 formado durante 48 h de incubación en el medio líquido BHI con etanol (0, 2, 4, 6 y 8 % (v/v)) y nisina (■ 0 y ▨ 6 µg/ml). La línea punteada verde indica el límite por encima del cual se considera la formación de biofilm positiva. B) Población total de células viables (UFC/ml) en los medios con BHI con etanol (0, 2, 4, 6 y 8 %) y con ■ 0 y ▨ 6 µg/ml de nisina. La línea roja rayada indica la población inicial de células (7×10^7 UFC/ml).

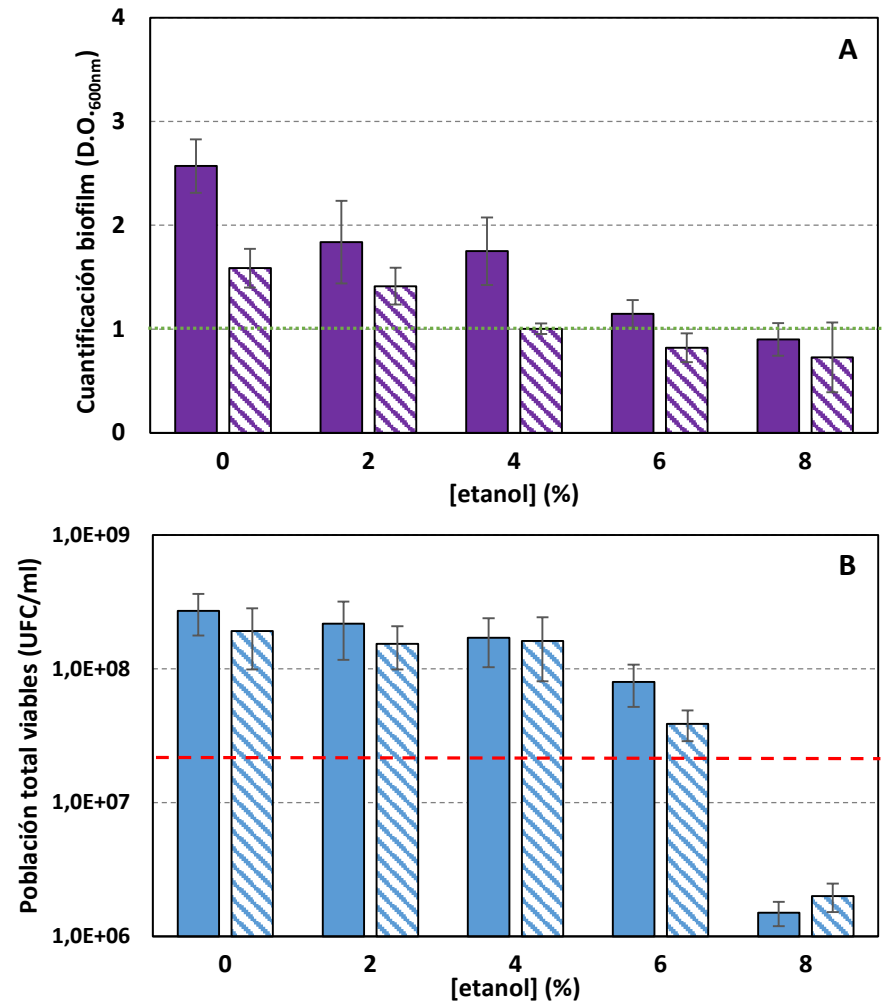


Figura III-48. A) Cuantificación del biofilm de la cepa *O. oeni* IS151 formado durante 48 h de incubación en el medio líquido BHI con etanol (0, 2, 4, 6 y 8 % (v/v)) y nisina (■ 0 y ▨ 6 µg/ml). La línea punteada verde indica el límite por encima del cual se considera la formación de biofilm positiva. B) Población total de células viables (UFC/ml) en los medios con BHI con etanol (0, 2, 4, 6 y 8 %) y con ■ 0 y ▨ 6 µg/ml de nisina. La línea roja rayada indica la población inicial de células ($3,6 \times 10^7$ UFC/ml).

Las **Figuras III-45 A, III-46 A, III-47 A y III-48 A** anteriores muestran que cuando las cepas estudiadas estaban en forma planctónica y se incubaban en el medio con 6 % etanol y 6 µg/ml de nisina, ya no fueron capaces de formar el biofilm que en ausencia de nisina sí formaban; incluso la cepa J32 de mayor capacidad formadora de biofilm no lo pudo generar. Este efecto fue aún más notable con las cepas J39 e IS151 (**Figuras III-47 A y III-48 A**) que tampoco con 2 % o 4 % de etanol respectivamente pudieron generar el biofilm cuando estaba presente la nisina. Este efecto inhibitor del etanol en combinación con la nisina también se observa en las poblaciones de células viables (**Figuras 45 B, 46 B, 47 B y 48 B**) indicando la inhibición del crecimiento celular por una actuación conjunta de ambos antimicrobianos, así como la inhibición de los mecanismos de formación del biofilm. Tal y como se ha indicado en el apartado de Introducción, la nisina actúa a nivel de la membrana plasmática de las bacterias, provocando la formación de poros ([Cotter et al., 2005](#)) a través de los cuales las células pierden su contenido y se provoca eventualmente la muerte celular, contribuyendo a este efecto inhibitor del crecimiento la presencia de etanol en el medio acuoso, tal y como también se muestra en el trabajo de [Rojo-Bezares y col. \(2007\)](#) en el cual se demuestra el efecto conjunto de ambos antimicrobianos inhibiendo el crecimiento de las BL en forma planctónica.

b) Bacterias inicialmente en forma de biofilm

En la **Figura III-49** siguiente se muestran los resultados obtenidos para las cuatro cepas de BL estudiadas al añadir esta vez sobre un biofilm de células previamente formado en ausencia de etanol, medio fresco con distintas concentraciones de etanol (0, 2, 4, 6 y 8 %) en combinación con 0 y 6 µg/ml de nisina, y de mantener en incubación durante 24 h, según se describe en el apartado 3.7. de Materiales y Métodos. En las **Figuras III-49 A, B, C y D** se muestran respectivamente los resultados para las cepas J32, J57, J39 e IS151 y se indica con una línea roja el biofilm inicial de células sobre el que se añadió medio fresco con las distintas concentraciones de etanol y de nisina.

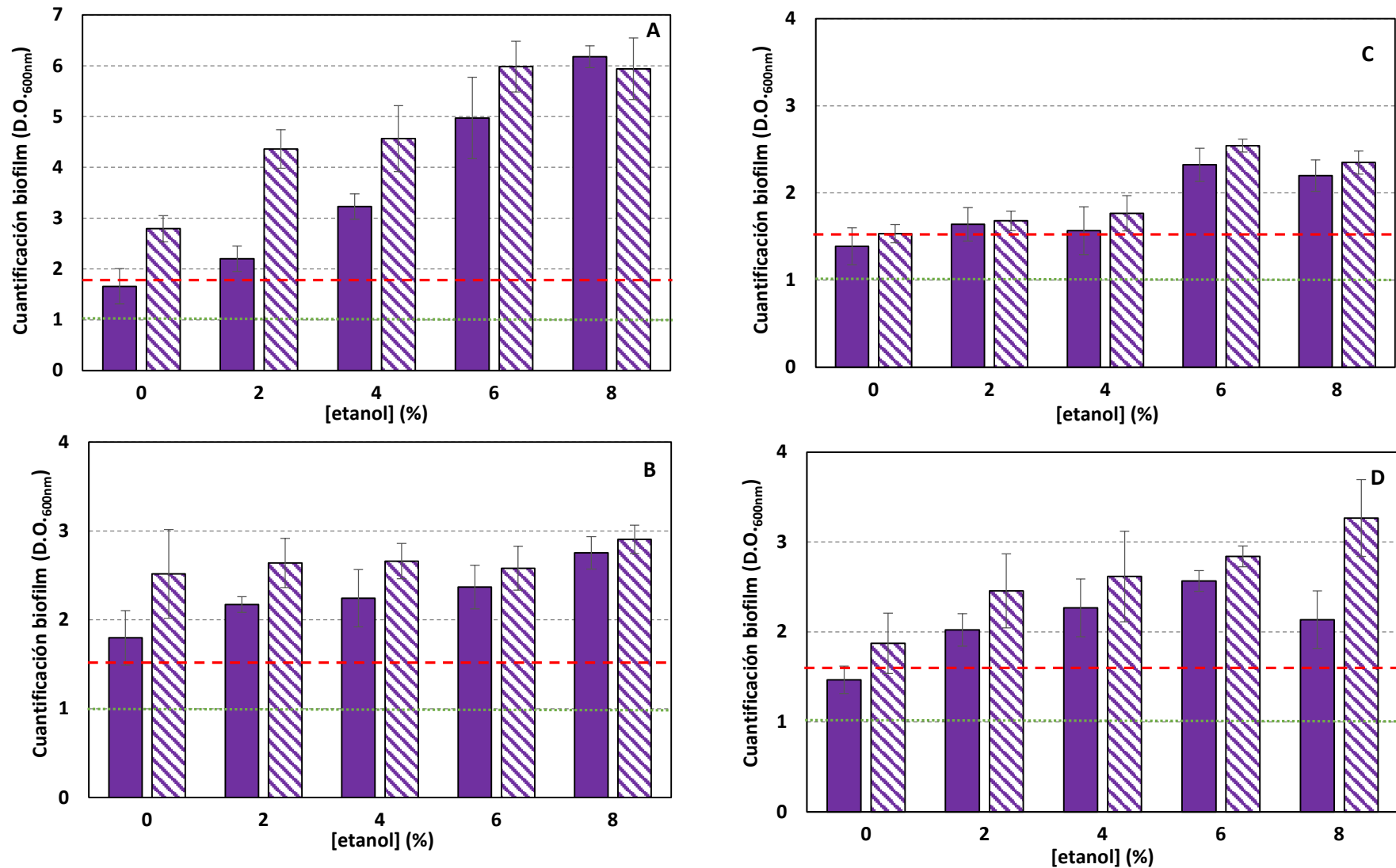


Figura III-49. Cuantificación del biofilm de la cepas después de 24 h de incubación de un biofilm formado (durante 48h en BHI) con etanol y nisina (BHI con 0, 2, 4, 6 y 8 % etanol con 0 y 6 μg/ml de nisina) para las cepas A) *L. mesenteroides* J32; B) *L. mesenteroides* J57; C) *L. plantarum* J39 y D) *O. oeni* IS151. La línea punteada verde indica el límite por encima del cual se considera la formación de biofilm positiva. La línea rayada roja indica el biofilm inicial formado antes de la adición del medio con etanol y/o nisina [D.O._{600nm}=1,9 (A); 1,5 (B); 1,5 (C) y 1,5 (D)].

Como puede observarse, los resultados obtenidos al añadir el medio con los dos antimicrobianos sobre las células en forma de biofilm son totalmente diferentes a los anteriores obtenidos partiendo de células planctónicas. La **Figura III-49** muestra que se produce una clara activación de la producción del biofilm conforme aumenta la concentración añadida de etanol combinada con 6 µg/ml de nisina, y la presencia de la nisina tiene un efecto potenciador de esa formación del biofilm. De nuevo los resultados vuelven a mostrar que las células bacterianas en forma de biofilm presentan una mayor resistencia a los agentes antimicrobianos, el biofilm activa su engrosamiento en presencia éstos, y además, el efecto activador del etanol que se había visto en los resultados de las **Figuras III-31 A, III-32 A, III-33 A y III-34 A** del apartado 2.5 anterior del efecto del etanol sobre la formación del biofilm se repite en estos ensayos y se ve potenciado por la presencia de la concentración subinhibitoria de nisina. Según la revisión bibliográfica realizada, éstos son los primeros resultados que evidencian un efecto activador de la formación de un biofilm de BL por la presencia de la nisina en concentraciones subinhibitorias, tanto en ausencia como en presencia del etanol. Trabajos anteriores realizados con esta bacteriocina habían puesto de manifiesto la capacidad de la nisina de inhibir el crecimiento y la formación de biofilms de bacterias Gram-positivas, siendo la mayoría de los estudios realizados con bacterias patógenas responsables de infecciones en humanos (*S. aureus*, *Streptococcus mutans*) (Pimentel-Filho *et al.*, 2014; Okuda *et al.*, 2013; Mataraci y Dosler, 2012; Tong *et al.*, 2010 y 2014), y un único trabajo realizado con *S. aureus* (Sudgidan & Yemenicioglu, 2012) indicaba que la nisina en concentraciones subinhibitorias no tenía ningún efecto sobre la formación del biofilm. En otras bacterias responsables de infecciones alimentarias (*Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*) también se ha referenciado la capacidad de la nisina de inhibir la formación de biofilms (Benmechernene *et al.*, 2013; Guerra *et al.*, 2005) sin indicar en ningún trabajo resultado alguno con el efecto opuesto. En relación a aplicaciones enológicas, cabe destacar un trabajo publicado por Nel y col. (2002) que indicaba que la nisina tenía actividad biocida sobre células de *O. oeni* en biofilms formados sobre superficies de acero inoxidable. Nuestros resultados indican que concentraciones subinhibitorias de este péptido antimicrobiano tienen un efecto contrario al deseado, es decir, favorecen el engrosamiento de un biofilm de BL previamente formado, tanto en ausencia de etanol como en condiciones de presencia de etanol propias del entorno enológico.

De forma análoga al efecto del etanol en concentraciones tolerables por un biofilm de BL previamente formado que se ha discutido en el apartado 2.5 anterior, y siguiendo el modelo para la formación del biofilm en bacterias Gram-positivas (Vlamakis *et al.*, 2013) se puede explicar este efecto de concentraciones no biocidas de nisina por su capacidad de insertarse en la membrana celular de las BL, liberar parcialmente su contenido celular, y de este modo desencadenar la señal

necesaria para que las BL activen su mecanismo de respuesta en cascada de señalización generando aún más biofilm. Como ya se ha indicado anteriormente, se encuentra referenciada en la bibliografía el efecto de inducción de la formación del biofilm de bacterias Gram-positivas por concentraciones subinhibitorias de diversos agentes antimicrobianos, como el fungicida nistatina y antibióticos de uso clínico (Vlamakis *et al.*, 2013; Shemesh *et al.*, 2010; Redelman *et al.*, 2012; Rachid *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2012), así como en bacterias Gram-negativas e importantes patógenos humanos, como *Pseudomonas aeruginosa* o *Vibrio cholerae* (Laverty *et al.*, 2014; O'Toole & Stewart, 2005; Hoffmann *et al.*, 2005). Sin embargo, no se han encontrado referencias sobre la activación de la formación del biofilm en bacterias Gram-positivas por concentraciones subinhibitorias de la nisina o de otras bacteriocinas.

4.3. Efecto de la nisina en concentración inhibitoria del crecimiento sobre la formación de biofilms de bacterias lácticas enológicas

Puesto que desde el punto de vista de producción de vinos, el objetivo planteado era encontrar condiciones adecuadas para evitar la formación de biofilms de las bacterias enológicas, se pasó a estudiar el efecto de la nisina en una concentración elevada (200 µg/ml), próxima a su CMI, en combinación con las distintas concentraciones de etanol. De forma semejante a los ensayos del apartado 4.2 anterior, se realizó este estudio con células planctónicas de las BL y con células previamente crecidas en forma de biofilm en ausencia de los antimicrobianos, pero se emplearon únicamente las cepas J32, J57 y J39 y la cepa *O. oeni* IS151 no se incluyó en el análisis debido a que la concentración de 200 µg/ml era muy superior a la CMI inhibitoria de su crecimiento.

a) Bacterias inicialmente en estado planctónico

En la **Figura III-50 (A, B y C)** se muestran los resultados obtenidos para las tres cepas J32, J57 y J39 que se encontraban inicialmente en forma planctónica y que se incubaron durante 48 horas en el medio BHI con las concentraciones de etanol (0, 2, 4, 6 y 8 %) (v/v) sin nisina y en combinación con 200 µg/ml de nisina, según describe en el apartado 3.6. de Materiales y Métodos.

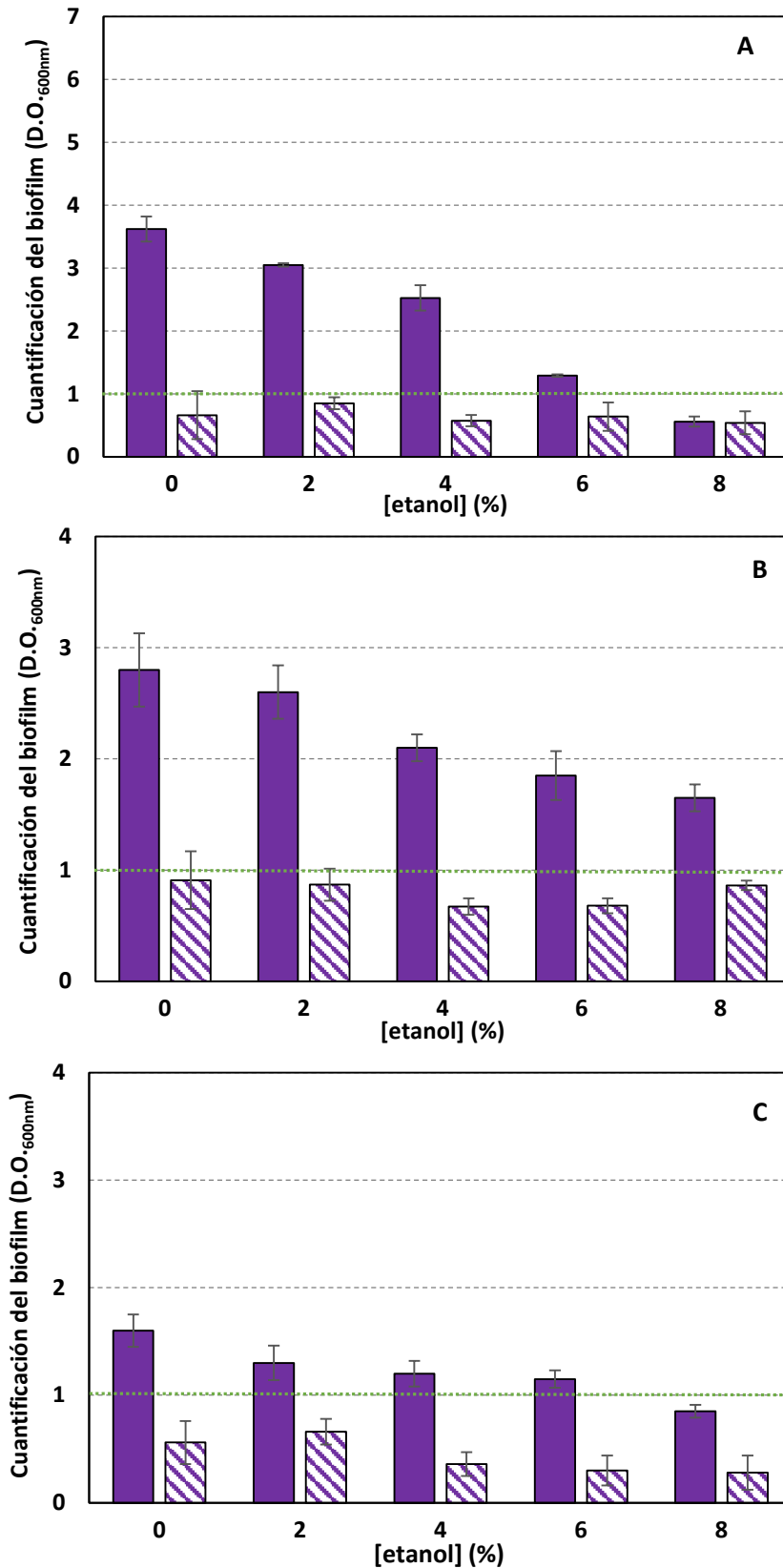


Figura III-50. Biofilm formado durante 48 h en el medio BHI con 0, 2, 4, 6 y 8 % etanol en combinación con 0 y 200 µg/ml de nisina para las cepas: A) *L. mesenteroides* J32; B) *L. mesenteroides* J57 y C) *L. plantarum* J39. La línea verde de puntos indica el valor por encima del cual se considera positiva la formación de biofilm.

En estos resultados de la **Figura III-50** se puede observar que las células planctónicas de BL no formaron biofilm en presencia de la alta concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ de nisina (próxima a su CMI, inhibidora del crecimiento celular), ni en presencia ni en ausencia de etanol en el medio. De forma semejante a lo mostrado en los resultados de los ensayos donde se estudió el efecto del etanol (**Figuras III-27, III-28, III-29 y III-30** del apartado 2.5 anterior), en la **Figura III-50** se observa que a mayor concentración de etanol añadido sobre las células planctónicas, menor es el biofilm formado, pero el efecto de la alta concentración de nisina es aún más notable que el efecto del etanol en las concentraciones ensayadas (hasta 8 % v/v), y en ningún caso las células de BL planctónicas lograron formar el biofilm en presencia de la concentración alta de nisina.

b) Bacterias inicialmente en forma de biofilm

En la **Figura III-51 (A, B y C)** se muestran los resultados obtenidos para las tres cepas (J32, J57 y J39) cuando se realizó el ensayo de adición de las distintas concentraciones de etanol (0, 2, 4, 6 y 8 % v/v) y de nisina (0 y 200 $\mu\text{g/ml}$) sobre las células de un biofilm previamente formado en ausencia de los antimicrobianos (método descrito en el apartado 3.7. de Materiales y Métodos). Como puede observarse en la figura el resultado de este ensayo fue la fuerte inhibición del crecimiento celular por la concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ de nisina, y tuvo como consecuencia que el biofilm inicial no aumentara, de modo que la nisina fue capaz de inhibir la formación de más biofilm y contrarrestar el efecto activador de la producción de biofilm que ejercía el etanol.

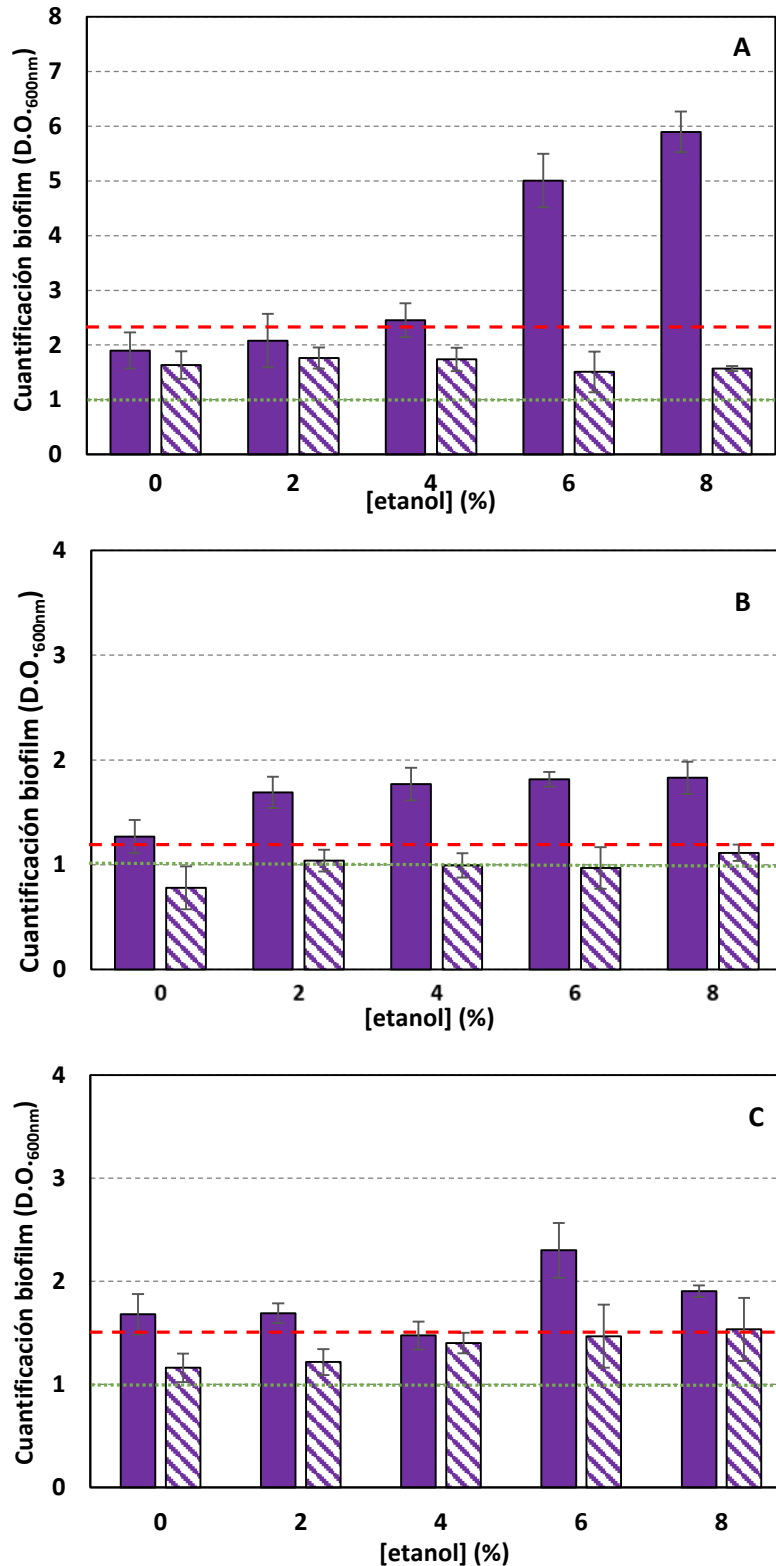


Figura III-51. Biofilm formado a las 24 h de incubación en BHI con 0, 2, 4, 6 y 8% etanol en combinación con 0 y 200 μg/ml de nisina. Medio añadido sobre un biofilm previamente formado durante 48h en BHI sin los antimicrobianos, de las cepas: A) *L. mesenteroides* J32; B) *L. mesenteroides* J57 y C) *L. plantarum* J39. La línea verde de puntos indica el valor por encima del cual se considera positiva la formación de biofilm. La línea roja rayada indica el biofilm inicial antes de las adiciones del medio con etanol y/o nisina [D.O._{600nm} = 2,2 (A); 1,2 (B); 1,5(C)].

Como se ve en estos ensayos, la nisina en alta concentración, próxima a su CMI, ya no ejercía el efecto activador de la síntesis del biofilm que se observaba a concentraciones subinhibitorias, con lo cual se confirman los resultados presentados por otros autores que recomiendan el uso de la nisina como agente antimicrobiano y con propiedades anti-biofilm. En este sentido, el trabajo de [Mahdavi y col. \(2007\)](#) propone el empleo de la nisina (4×10^3 IU/ml, equivalente a 4 mg/ml) para eliminar biofilms de patógenos en alimentos (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. enteritidis*) y un cierto número de patentes proponen el empleo de la nisina con el mismo fin ([Benmechernene et al., 2013](#)) o de la nisina inmovilizada en el celofán para el empaquetado de alimentos ([Guerra et al., 2005](#)).

Podemos concluir por tanto, que la nisina sería un agente antimicrobiano eficaz contra BL cuando se encuentra en una concentración suficientemente elevada que alcance su CMI, lo cual impide tanto la formación como el crecimiento de biofilms de BL.

4.4. Efecto de la nisina sobre la capacidad formadora de biofilm de bacterias acéticas

Ya en el apartado 1.3. se indicó que visualmente se podía apreciar que bacterias acéticas aisladas del vinagre formaban biofilm en la placa de cultivo, y nos planteamos estudiar la capacidad de formar biofilm de una colección de 11 aislados de estas bacterias obtenidos de muestras de vinagres, y del posible efecto de la nisina sobre su capacidad de formar el biofilm.

En primer lugar se realizó el ensayo para el cálculo de la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de los tres antimicrobianos: metabisulfito, etanol y nisina frente a las BA crecidas en forma planctónica en medio líquido, según se describe en el apartado 3.5.a de Materiales y Métodos y los resultados se muestran en la **Tabla III-11**.

Tabla III-11. Valores de CMI del MBS (metabisulfito), el etanol y la nisina contra las BA analizadas.

	CMI MBS ($\mu\text{g/ml}$)	CMI etanol (%) (v/v)	CMI nisina ($\mu\text{g/ml}$)
R1 (<i>Ga. europaeus</i>)	75	15	200
R30 (<i>A. pasteurianus</i>)	75	7,5	100
R46 (<i>Ga. xylinus</i>)	37,5	15	200
R49 (<i>Ga. xylinus</i>)	37,5	7,5	200
R90 (<i>A. pasteurianus</i>)	75	7,5	200

Según los resultados mostrados en la **Tabla III-11**, las BA mostraron sensibilidad al metabisulfito, cuya CMI se encontraba entre 37,5-75 $\mu\text{g/ml}$. Respecto al etanol la CMI está alrededor de 7,5-15% para todas las cepas. La nisina inhibió el crecimiento de estas bacterias en medio MRS-líquido con una concentración de 100-200 $\mu\text{g/ml}$, resultado como el encontrado para BA de origen enológico por [Rojo-Bezares y col. \(2007\)](#).

Para cuantificar el biofilm formado se intentó emplear el método puesto a punto para las BL, pero resultó infructuoso, posiblemente debido a la poca oxigenación del cultivo en el ensayo, lo cual impide el crecimiento de estas bacterias aerobias estrictas. Por otro lado, al dar pase a las cepas en las placas de medio sólido se podía ver fácilmente la formación de una capa mucosa y la formación de filamentos al tomar la película con el asa de siembra. De modo que se optó por evaluar el denominado carácter "ropy" de nuestras cepas mediante el test descrito en el apartado 3.3. de Materiales y Métodos. Los resultados de esta evaluación del carácter "ropy" en diferentes medios se muestran en la siguiente **Tabla III-12**.

Tabla III-12. Análisis de la capacidad de formar biofilm de BA aisladas de vinagre mediante el test "ropy".

Cepa	Especie	Origen	Medio de cultivo		
			MRS	MRS + 100 $\mu\text{g/ml}$ de nisina	MRS + 200 $\mu\text{g/ml}$ de nisina
R1	<i>Ga. europaeus</i>	Vinagre de vino	-	-	-
R3	<i>Ga. europaeus</i>	Vinagre de vino	-	-	-
R30	<i>A. pasteurianus</i>	Vinagre de sidra	-	-	-
R35	<i>Ga. xylinus</i>	Vinagre de sidra	+	+	+
R36	<i>Ga. xylinus</i>	Vinagre de sidra	+	+	+
R39	<i>Ga. europaeus</i>	Vinagre de sidra	-	-	-
R41	<i>Ga. xylinus</i>	Vinagre de sidra	-	-	-
R46	<i>Ga. xylinus</i>	Vinagre de sidra	+	+	+
R48	<i>Ga. europaeus</i>	Vinagre de sidra	-	-	-
R49	<i>Ga. xylinus</i>	Vinagre de sidra	+	+	+
R90	<i>A. pasteurianus</i>	Vinagre de sidra	-	-	-

+ significa test ropy positivo (formación de un filamento al tomar con el asa de siembra)

- significa test ropy negativo (no formación de un filamento al tomar con el asa de siembra)

Se encontró que el 36,4 % de las cepas ensayadas presentó carácter “ropy”. La presencia de nisina en el medio (bien 100 µg/ml o 200 µg/ml) no afectó a las cepas que presentaban carácter “ropy”, como se muestra en la **Tabla III-12**, y tampoco influyó en la formación de biofilm del resto de cepas que continuaron siendo negativas. Por lo tanto, estos resultados muestran que la presencia de nisina en el medio sólido no impidió la formación del biofilm de BA a pesar de ser una concentración inhibitoria del crecimiento celular de las BA planctónicas en el cultivo líquido.

La capacidad de formar biofilm de las BA contaminantes de un vino se puede visualizar fácilmente en el cuello de la botella cuando no se almacenan tumbadas y se permite la entrada de aire en la botella (Bartowsky *et al.*, 2003, Bartowsky & Henschke 2008). En el caso de la elaboración de vinagres por el método tradicional la formación del velo o biofilm de células en la superficie del cultivo de las BA responsables de la acetificación, es la característica de este tipo de elaboraciones de vinagres tradicionales. En nuestro caso, todos los aislados positivos en el análisis provenían de vinagres de sidra elaborados por el método sumergido y eran de la especie *Ga. xylinus*, considerada como microorganismo modelo para la producción de celulosa como EPS y constituyente del biofilm que generan (Valera *et al.*, 2015). La biosíntesis de esa celulosa extracelular se encuentra bien descrita en la bibliografía y se encuentra regulada por el operón *bcsABZC* (también denominado *acsABZC* o *ceLABZC*) dentro del cual el gen *bcsA* es el más conservado y codifica la celulosa-sintasa necesaria para la biosíntesis de la celulosa (Valera *et al.*, 2015).

Un producto utilizado actualmente para evitar la formación de biofilms de bacterias contaminantes es el quitosán (Orgaz *et al.*, 2011), un polisacárido natural derivado de la quitina, muy desacetilado y que para su uso enológico debe ser de origen fúngico. La nisina en su concentración CMI podría ser igualmente empleada como agente antimicrobiano y preventivo de la formación de biofilms, y presentaría la ventaja de que además de actuar sobre la formación del biofilm podría controlar el crecimiento de algunas bacterias perjudiciales para la calidad del vino. La nisina, y otros péptidos antimicrobianos como la pediocina (Díez *et al.*, 2012) son desinfectantes naturales y seguros biológicamente, y constituyen una alternativa prometedora frente a las estrategias convencionales de la industria enológica, donde el uso del SO₂ está cada vez más restringido.

5. METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS DE *Lactococcus lactis* EN PRESENCIA DE ETANOL

Trabajos transcriptómicos previos del grupo de investigación realizados con la especie *L. lactis* habían puesto de manifiesto la sobreexpresión de los genes de la ruta arginina deiminasa (vía ADI) por la presencia de 2 % de etanol en el medio de cultivo, sugiriendo con ello que la utilización de la arginina mediante la ruta ADI podía contribuir a la supervivencia y crecimiento de esta especie *L. lactis* en presencia del etanol. A la vista de estos resultados a nivel transcriptómico, el objetivo de nuestro estudio fue comprobar si en efecto se inducía la vía ADI de degradación de la arginina como respuesta a la presencia de etanol en el medio de cultivo de *L. lactis*, y evaluar los cambios que podían producirse en los metabolitos extracelulares generados en las rutas de aminoácidos, incluidas entre ellos las aminas biógenas y el ión amonio, como respuesta a la presencia del etanol en el medio de cultivo. Para este estudio metabólico se emplearon: la cepa modelo *L. lactis* MG1363, prototipo internacional para estudios genéticos y fisiológicos en BL, y 3 de sus mutantes defectivos en los genes *ahrC* y *argR* (reguladores de la vía de síntesis y degradación de la arginina). Estos mutantes fueron los denominados MG Δ *argR* (defectivo del gen *argR*) con ruta ADI y síntesis de arginina activas, MG Δ *ahrC* (defectivo del gen *ahrC* que activa la vía ADI de degradación de la arginina) y el doble mutante MG Δ *argR* Δ *ahrC* estos dos últimos con ruta ADI inactiva y síntesis de arginina activa (Larsen *et al.*, 2004).

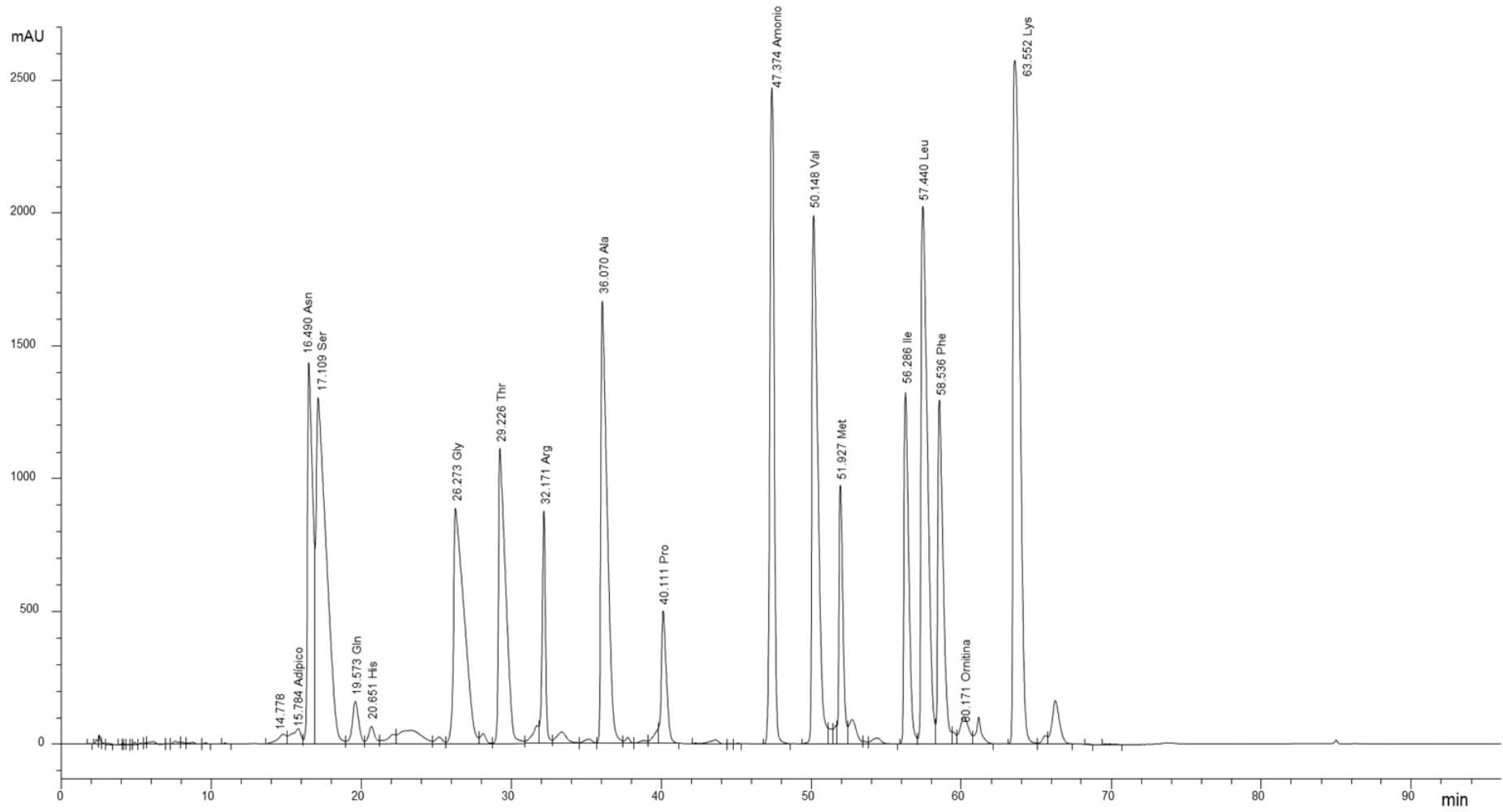
5.1. Análisis de compuestos aminados mediante HPLC de fase reversa

Se empleó el método descrito por Gómez-Alonso y col. (2007) basado en la derivatización del grupo amino con el reactivo dietil-etoxi-metilen-malonato (DEEMM) y la posterior separación, identificación y cuantificación de los compuestos en una columna de fase reversa, tal y como se indica en el apartado 5.2. de Materiales y Métodos. Se realizaron las rectas de calibrado para los diferentes aminoácidos analizados, para el ión amonio y distintas aminas biógenas, y las ecuaciones obtenidas para las rectas de calibrado correspondientes se muestran en la **Tabla III-13**.

En la **Figura III-52** se muestra a modo de ejemplo el cromatograma que se obtuvo para una muestra tomada a tiempo cero en el medio CDM con arginina.

Tabla III-13. Rectas de calibrado obtenidas para los aminoácidos y aminos biógenos analizados.

Nombre	Ecuación	Coefficiente de correlación	Tiempo de retención
Ala	$y = 80,101x + 0,006$	$R^2 = 0,9999$	35,746
Amonio	$y = 0,0132x - 0,0041$	$R^2 = 0,9969$	47,168
Arg	$y = 47,672x - 0,0061$	$R^2 = 0,9995$	31,883
Asn	$y = 55,529x + 0,0438$	$R^2 = 0,9992$	17,029
Gly	$y = 82,986x + 0,0469$	$R^2 = 0,9995$	27,563
Ile	$y = 50,734x - 0,0076$	$R^2 = 0,9993$	55,104
Leu	$y = 36,898x + 0,5884$	$R^2 = 0,9967$	57,684
Lys	$y = 65,772x + 0,0014$	$R^2 = 0,9999$	62,313
Met	$y = 50,343x - 0,0238$	$R^2 = 0,9993$	51,940
Ornitina	$y = 78,566x + 0,1198$	$R^2 = 0,9981$	60,496
Phe	$y = 41,305x + 0,0623$	$R^2 = 0,9992$	58,497
Ser	$y = 78,648x + 0,1407$	$R^2 = 0,9996$	17,573
Thr	$y = 70,65x + 0,018$	$R^2 = 0,9999$	29,476
Val	$y = 66,911x + 0,1886$	$R^2 = 0,9993$	50,190
Espermidina	$y = 42,423x - 0,0224$	$R^2 = 0,9975$	65,696

Figura III-52. Cromatograma de la muestra de la cepa MG Δ ahrC a t=0 con el tratamiento: Con Arg y 0% etanol.

5.2. Utilización de arginina por *L. lactis* en presencia de etanol en el medio de cultivo

Tal y como se indica en el apartado 5.1. de Materiales y Métodos, se utilizó el medio químicamente definido CDM, basado en el previamente descrito por Larsen y col. (2004) para el crecimiento de esta especie. No se adicionaron los aminoácidos glutamato ni glutamina para evitar la ruta rápida de síntesis de la arginina a partir de ellos, lo cual podía distorsionar los resultados referentes al metabolismo de la arginina, ya que las 4 cepas estudiadas no tienen reprimida la ruta de síntesis de la arginina. Con respecto al primer objetivo de estudiar si la vía ADI de degradación de la arginina se veía implicada en la respuesta al etanol, en las Figuras III-53 a 56 se muestran los resultados para las 4 cepas estudiadas (cepa wild type MG1363, y tres mutantes defectivos: $MG\Delta argR$, $MG\Delta ahrC$ y $MG\Delta argR\Delta ahrC$) obtenidos en el análisis de la concentración de arginina y de ornitina de las muestras tomadas en fase estacionaria de crecimiento bajo las cuatro condiciones estudiadas: en ausencia o en presencia de 2,5 mg/ml de arginina, y en ausencia o en presencia de 2 % (v/v) de etanol.

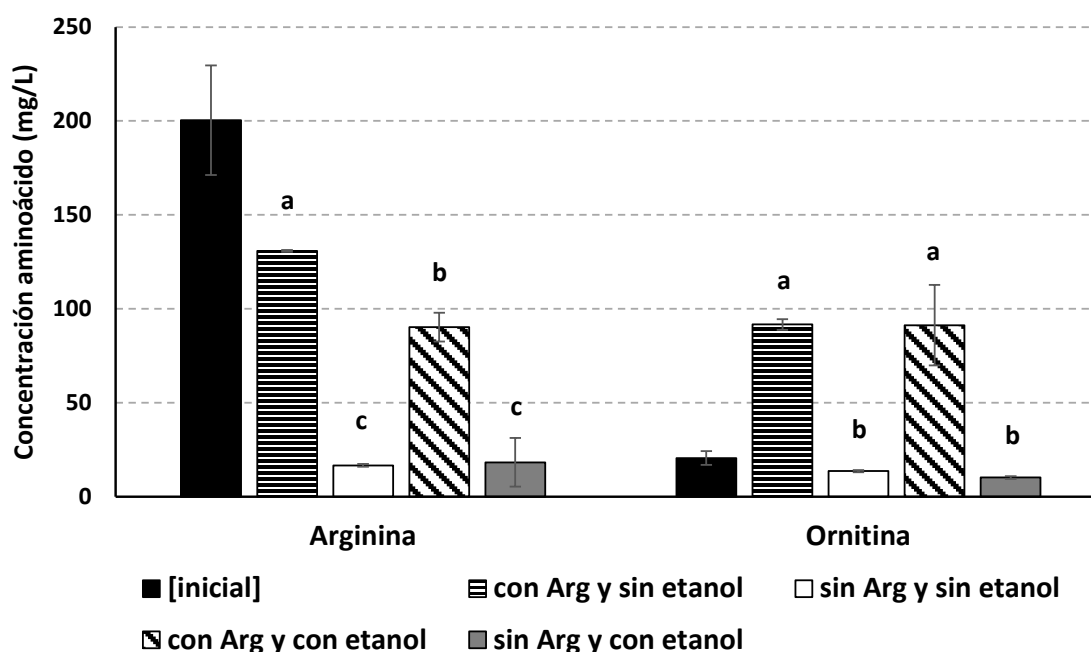


Figura III-53. Concentración de arginina y ornitina en el medio de cultivo de la cepa **MG1363** (wild type) en la fase estacionaria de crecimiento para los cuatro tratamientos ensayados: 1) Con 2,5 mg/ml Arg y sin etanol, 2) Sin Arg y sin etanol, 3) Con 2,5 mg/ml Arg y con 2 % etanol y 4) Sin Arg y con 2 % etanol. También se representa la concentración inicial a tiempo cero. Las diferentes letras indican diferencias significativas.

En la **Figura III-53** se puede observar que la cepa wild type MG1363, cuando tiene arginina disponible en el medio la utiliza y consume más arginina en presencia de etanol (quedando en el medio un 45 % de la concentración inicial) que en ausencia de él, produciendo ornitina (91,3 - 91,7 mg/ml), lo cual indica que la ruta de degradación de la arginina se activa por la presencia del etanol en el medio.

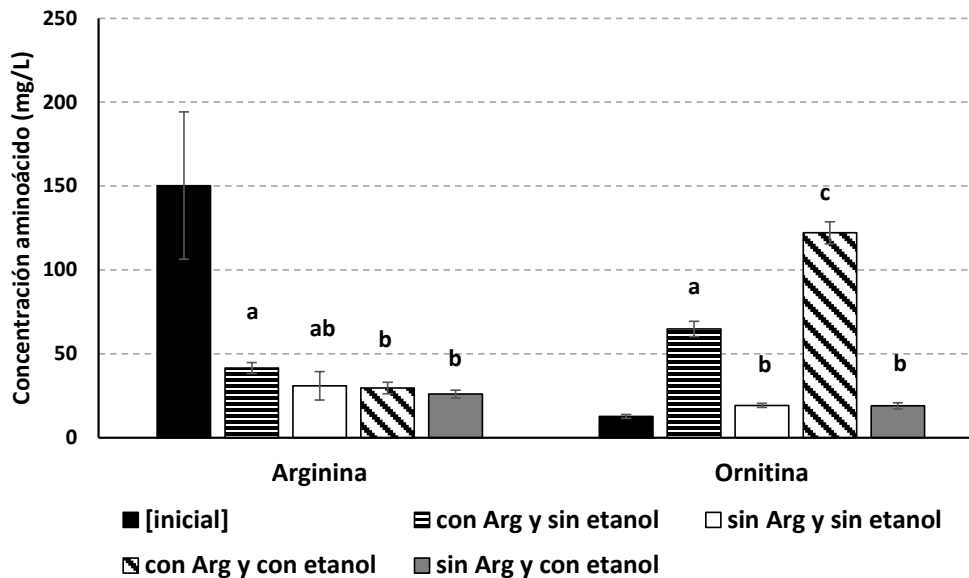


Figura III-54. Concentración de arginina y ornitina en el medio de cultivo de la cepa **MGΔargR** en la fase estacionaria de crecimiento para los cuatro tratamientos ensayados: 1) Con 2,5 mg/ml Arg y sin etanol, 2) Sin Arg y sin etanol, 3) Con 2,5 mg/ml Arg y con 2 % etanol y 4) Sin Arg y con 2 % etanol. También se representa la concentración inicial a tiempo cero. Las diferentes letras indican diferencias significativas.

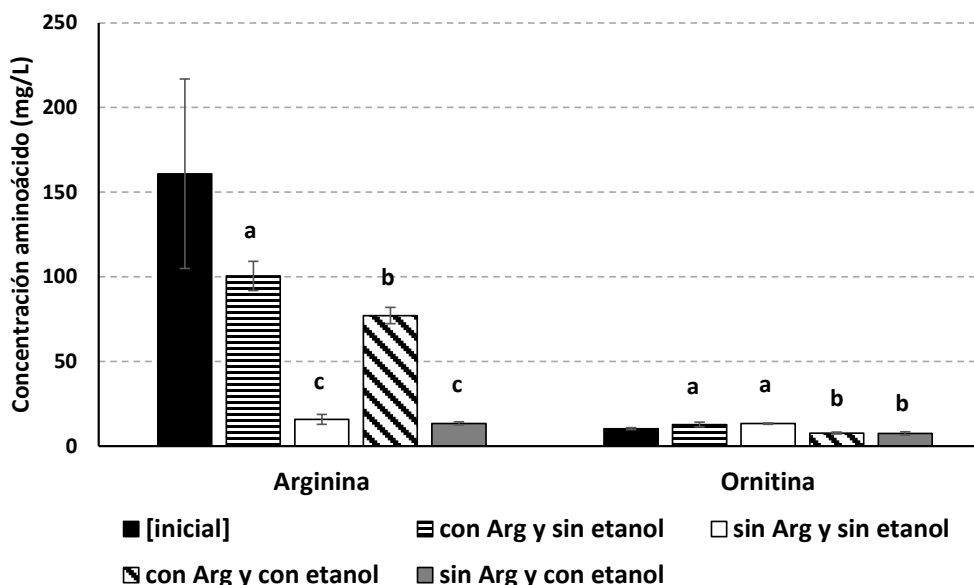


Figura III-55. Concentración de arginina y ornitina en el medio de cultivo de la cepa **MGΔahrC** en la fase estacionaria de crecimiento para los cuatro tratamientos ensayados: 1) Con 2,5 mg/ml Arg y sin etanol, 2) Sin Arg y sin etanol, 3) Con 2,5 mg/ml Arg y con 2 % etanol y 4) Sin Arg y con 2 % etanol. También se representa la concentración inicial a tiempo cero. Las diferentes letras indican diferencias significativas.

Para el mutante $MG\Delta argR$, que también presenta la ruta ADI activa, se puede observar en la **Figura III-54** que presenta un gran consumo de arginina y que utiliza la arginina casi hasta su totalidad, siendo la concentración de arginina en la fase estacionaria sólo del 28 % de la concentración inicial, y del 20 % cuando el cultivo se realiza en presencia del etanol. Y para este mutante la producción de ornitina es considerablemente más elevada en presencia de etanol (122,2 mg/l) que en ausencia de etanol (64,8 mg/l). Por lo tanto esta cepa también degrada la arginina por la ruta ADI y en mayor medida cuando crece en presencia del etanol.

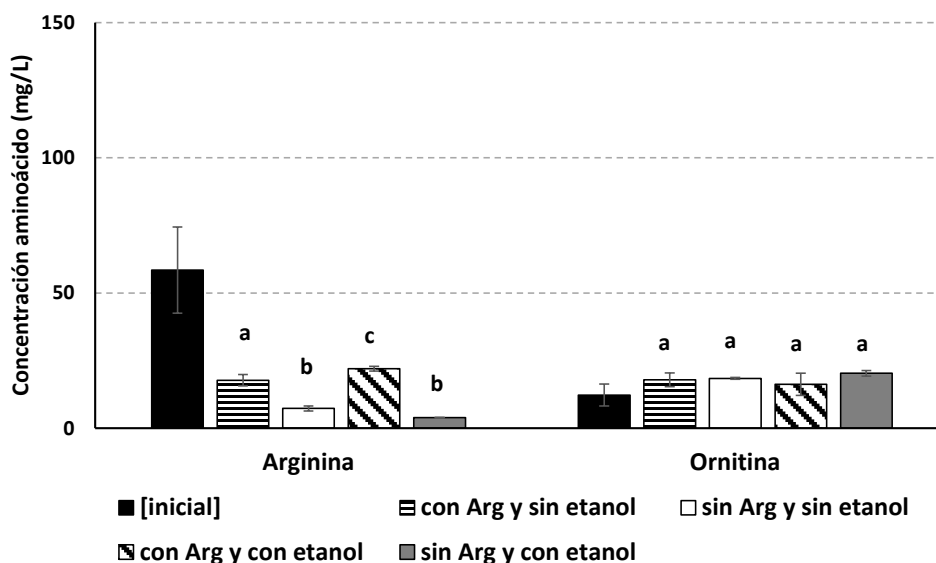


Figura III-56. Concentración de arginina y ornitina en el medio de cultivo de la cepa $MG\Delta argR\Delta ahrC$ en la fase estacionaria de crecimiento para los cuatro tratamientos ensayados: 1) Con 2,5 mg/ml Arg y sin etanol, 2) Sin Arg y sin etanol, 3) Con 2,5 mg/ml Arg y con 2 % etanol y 4) Sin Arg y con 2 % etanol. También se representa la concentración inicial a tiempo cero. Las diferentes letras indican diferencias significativas.

En la **Figura III-55** se observa que la cepa mutante $MG\Delta ahrC$, que no tiene activa la ruta ADI, no fue capaz de producir ornitina en ningún caso, tal y como era de esperar para este mutante defectivo. El doble mutante $MG\Delta argR\Delta ahrC$ presenta un comportamiento similar según se muestra en la **Figura III-56**; tampoco fue capaz de generar ornitina de forma significativa, ya que no tiene activa la ruta ADI. Ambas cepas utilizan la arginina que encuentran disponible en el medio para su crecimiento, pero no generan más ornitina. Cabe señalar que aparece una concentración residual de ornitina en todos los casos, entre 15-20 mg/L, la cual puede provenir de la liberación al medio del interior de bacterias lisadas durante el tratamiento.

La citrulina es un aminoácido que se forma como intermediario en la degradación de la arginina por la ruta ADI (**Figura III-57**). En nuestros experimentos no detectamos este aminoácido en ninguna muestra, lo cual indica que toda la arginina metabolizada mediante la ruta ADI pasó a convertirse en ornitina.

En este estudio metabólico se comprueba por tanto, que las cepas que tienen activa la ruta ADI producen ornitina (wild type MG1363 y $MG\Delta argR$), sin embargo los mutantes que no tienen activa esta ruta, no producen ornitina ($MG\DeltaahrC$ y $MG\Delta argR\DeltaahrC$).

En la ruta ADI de degradación de la arginina se genera ornitina, amonio y dióxido de carbono. Esta ruta ADI se lleva a cabo mediante la acción de tres enzimas: la arginina deiminasa, la ornitina carbamiltransferasa y la carbamato kinasa, pudiendo generar carbamil fosfato como compuesto intermedio que servirá para la síntesis de pirimidinas. Como se observa en la **Figura III-57**, la degradación de la arginina genera un balance energético positivo de 1 mol de ATP por cada mol de arginina degradado, energía que la célula puede utilizar para sobrevivir bajo las condiciones estresantes de etanol en el medio.

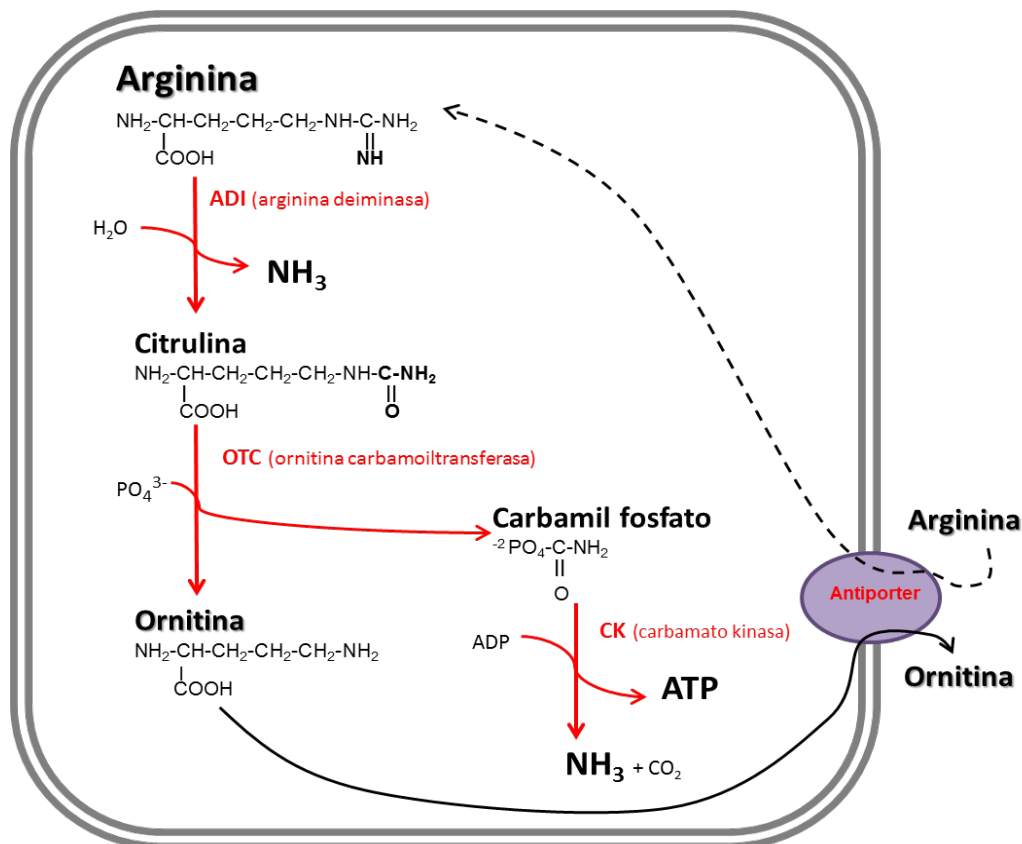


Figura III-57. Ruta ADI de degradación de la arginina.

Se encuentran referencias en la bibliografía que indican que *L. lactis* utiliza esta vía de degradación de la arginina como respuesta al estrés oxidativo que sufre durante la elaboración de quesos (Rochat *et al.*, 2012) y también como una vía de obtención de energía en condiciones de ausencia de azúcares (Brandsma *et al.*, 2012). Nuestro estudio es el primero que demuestra que esta ruta ADI de degradación de la arginina la utiliza *L. lactis* como mecanismo de respuesta al estrés generado por la presencia de etanol en el medio de cultivo.

5.3. Estudio de otros aminoácidos, amonio y aminos biógenos en el cultivo de *L. lactis* en presencia de etanol

Con respecto a otros metabolitos aminados presentes en el medio de cultivo tras la incubación de las cepas de *L. lactis* bajo las distintas condiciones estudiadas de ausencia o presencia de 2,5 mg/ml de arginina, y ausencia o en presencia de 2 % (v/v) de etanol, cabe señalar que no se detectó el ácido gamma-aminobutírico (GABA) ni la citrulina en ninguna de las muestras. Por otro lado, tal y como describían Gomez-Alonso y col. (2007), el análisis del aminoácido prolina no se realizó ya que la aminoenona derivada de la prolina no es estable y genera resultados inconsistentes.

En la **Figura III-58** se muestran los resultados obtenidos en el análisis del ion amonio presente en el medio de cultivo, para las 4 cepas estudiadas con los 4 tratamientos ensayados. Los resultados se representan mediante la relación entre la concentración del ión amonio en la muestra tomada en la fase estacionaria y su concentración inicial en el medio de cultivo, pudiendo así comparar la producción/consumo de ión amonio.

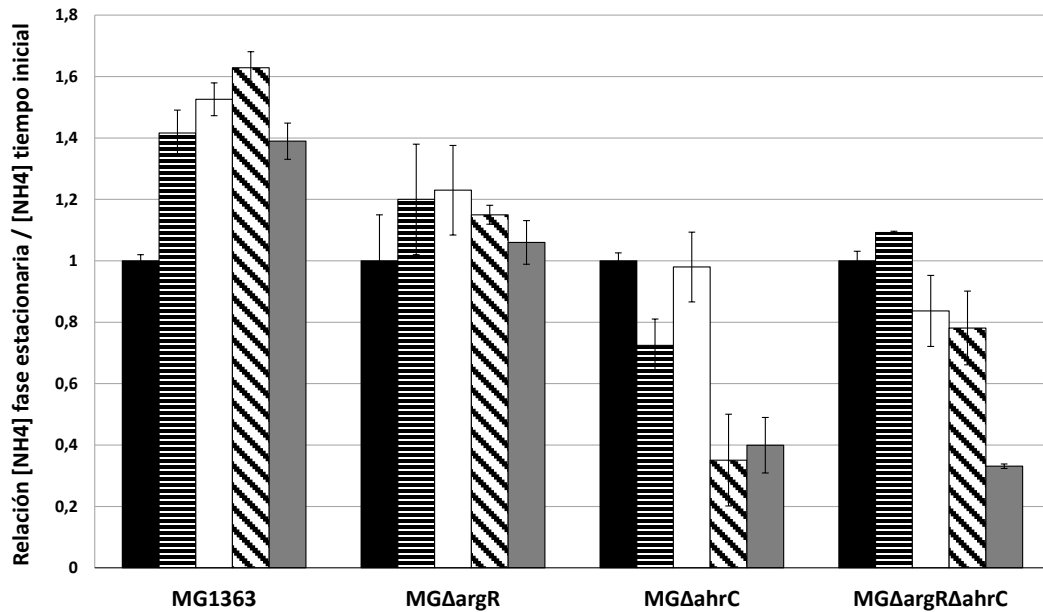
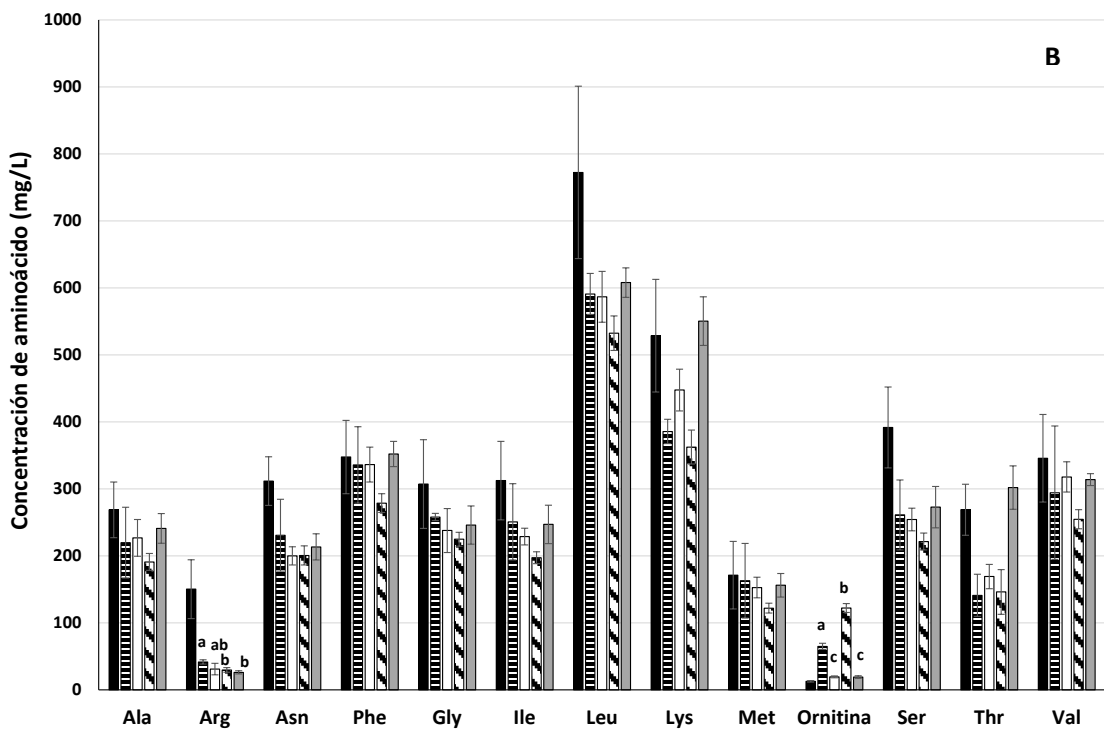
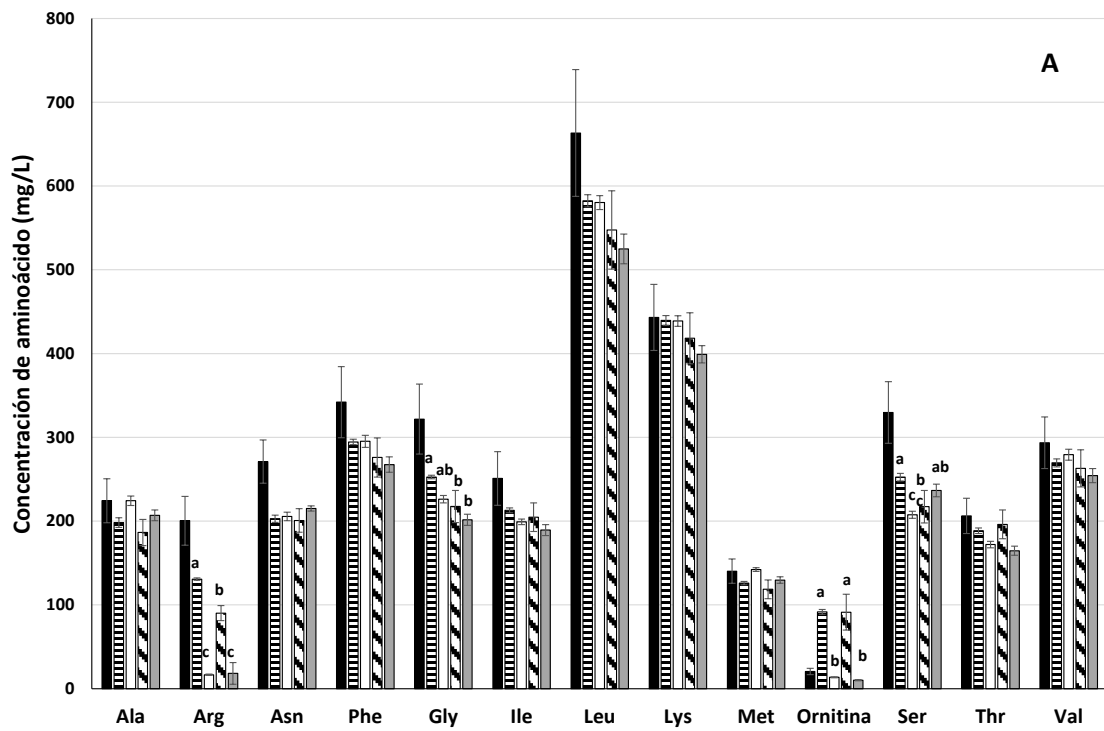


Figura III-58. Relación entre la concentración de amonio en el sobrenadante del cultivo en la fase estacionaria y la concentración inicial para los 4 tratamientos utilizados y las 4 cepas ensayadas. ■ Concentración inicial; ▨ Con arginina y sin etanol; □ Sin arginina y sin etanol; ▩ Con arginina y con etanol; ▭ Sin arginina y con etanol.

En la **Figura III-58** se puede observar que las cepas que presentan la ruta ADI activa (MG1363 y MGΔargR) generan amonio que es liberado al medio de cultivo, detectando en la fase estacionaria entre 1,4-1,6 veces la concentración inicial de amonio para MG1363 y entre 1,1-1,2 para la cepa MGΔargR. Esta producción de amonio podría ser debida a la degradación de la arginina mediante la ruta ADI, en cuyo balance global por cada mol de arginina degradado se producen 2 moles de amonio (Poolman *et al.*, 1987). Sin embargo para los mutantes que no poseen la ruta ADI activa, MGΔahrC y MGΔargRΔahrC, se puede observar en la **Figura III-58** que no se genera amonio y que se consume el que existía en el medio como fuente de nitrógeno para las BL. El amonio puede volver a entrar en el metabolismo del nitrógeno mediante la enzima glutamina sintetasa y ser utilizado para la producción de nuevos aminoácidos.

A continuación se representan los resultados obtenidos para el análisis de aminoácidos (**Figuras III-59 A-D**) para las cepas MG1363 (wild type), MGΔargR, MGΔahrC y MGΔargRΔahrC respectivamente, con los 4 tratamientos ensayados (los respectivos valores se muestran en las **Tablas III-14 a 17**). En dicha figura se muestra tanto la concentración inicial (antes de comenzar la incubación con la cepa correspondiente) como la concentración (mg/l) en el cultivo libre de células obtenido en la fase estacionaria (10 horas de cultivo).



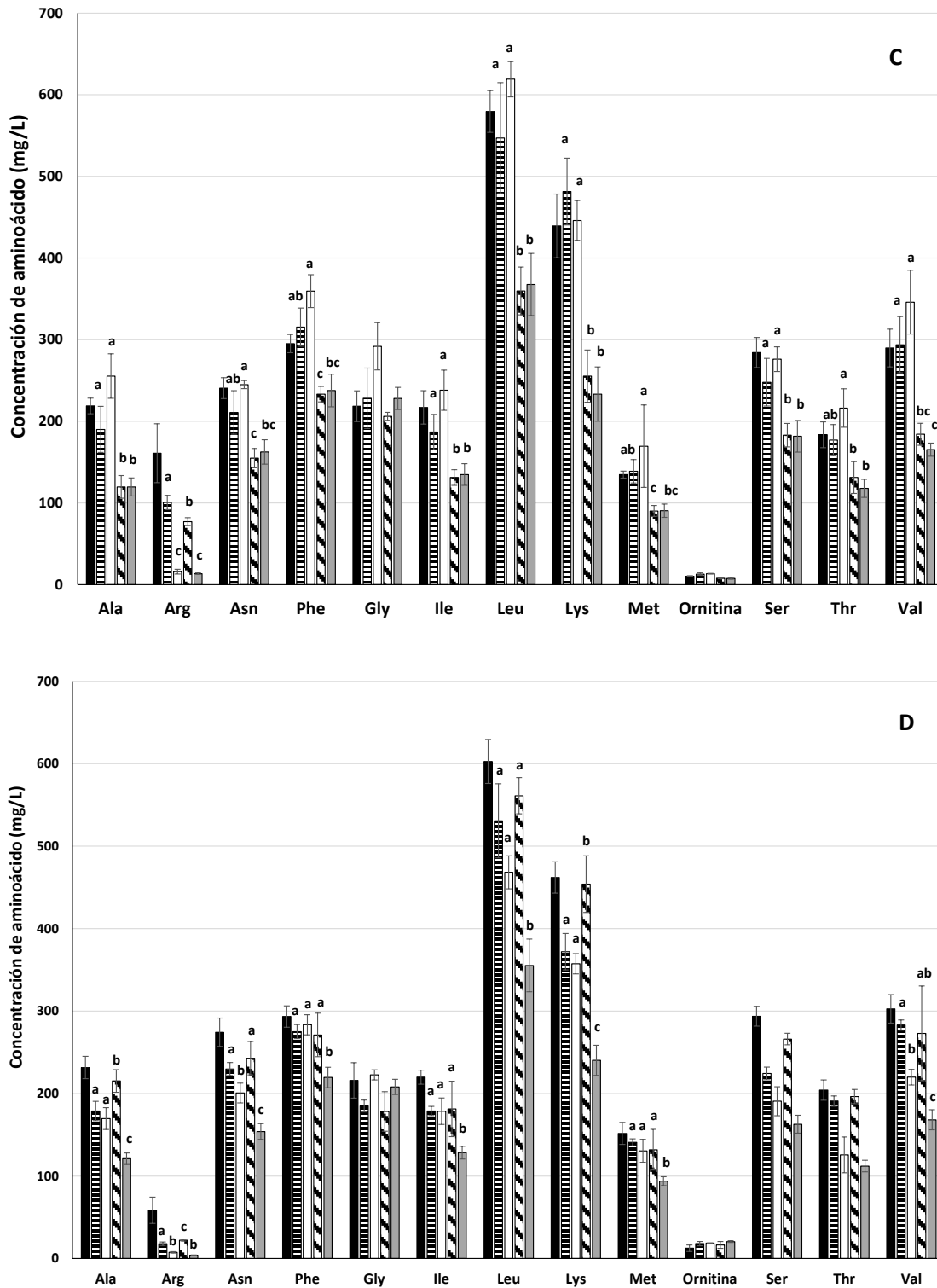


Figura III-59. Concentración de aminoácidos en los sobrenadantes de los cultivos de la cepa A) MG1363; B) MGΔargR; C) MGΔahrC; D) MGΔargRΔahrC bajo las 4 condiciones estudiadas: ▨ con 2,5 mg/ml Arg y sin etanol; □ sin Arg y sin etanol; ▩ con 2,5 mg/ml Arg y con 2% etanol; ▤ sin Arg y con 2% etanol y la ■ concentración inicial para cada aminoácido. Las diferentes letras indican diferencias significativas.

Como se ve en la **Fig. III-59 A**, la cepa wild type en presencia de etanol y con arginina disponible en el medio de cultivo, utiliza este aminoácido generando ornitina, y también utiliza Gly y Ser. Cuando no dispone de arginina en el medio y está en presencia del etanol, el aminoácido que utiliza preferentemente es la Gly. De forma similar el mutante $MG\Delta argR$ (**Figura III-59 B**) en presencia de etanol y con arginina en el medio, utiliza este aminoácido y genera ornitina, como ya se ha indicado en el apartado 4.2 y no utiliza preferentemente ningún otro aminoácido de los disponibles en el medio. El mutante $MG\Delta ahrC$ sin la vía ADI activa (**Figura III-59 C**) en presencia de etanol utiliza todos los aminoácidos disponibles en el medio de cultivo para su crecimiento y no se encuentran diferencias significativas en su consumo en presencia o en ausencia de arginina en el medio. De forma análoga, el mutante $MG\Delta argR\Delta ahrC$ (**Figura III-59 D**) con arginina y etanol en el medio, no utiliza selectivamente ningún aminoácido y cuando no dispone de arginina y está en presencia de etanol en el medio de cultivo utiliza más cantidad de los aminoácidos alifáticos Ala, Ile, Leu y Val, el azufrado Met, el aromático Phe y los aminoácidos Asn y Lys.

MG 1363	Con Arg y 0% etanol		Sin Arg y 0% etanol		Con Arg y 2% etanol		Sin Arg y 2% etanol	
	Concentración inicial (mg/L)	Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento	Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento	Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento	Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento	Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento	Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento	
Alanina	224,35 ± 26,20	198,24 ± 5,69 ^a	224,35 ± 5,66 ^b	186,46 ± 15,57 ^a	206,93 ± 6,49 ^{ab}			
Arginina	200,40 ± 29,15	130,78 ± 0,52 ^a	16,66 ± 0,78 ^c	90,22 ± 7,67 ^b	18,26 ± 12,95 ^c			
Asparagina	271,01 ± 25,83	202,82 ± 4,23 ^a	205,52 ± 5,14 ^a	200,78 ± 14,12 ^a	215,04 ± 3,10 ^a			
Fenilalanina	342,07 ± 42,44	294,51 ± 3,21 ^a	295,24 ± 7,23 ^a	275,95 ± 23,41 ^a	267,47 ± 9,22 ^a			
Glicina	321,79 ± 41,70	252,67 ± 2,08 ^a	226,19 ± 4,35 ^{ab}	217,45 ± 19,19 ^b	201,55 ± 6,64 ^b			
Isoleucina	250,98 ± 32,04	212,91 ± 2,85 ^a	199,22 ± 3,32 ^a	204,68 ± 16,98 ^a	189,36 ± 6,54 ^a			
Leucina	663,27 ± 75,69	582,26 ± 7,28 ^a	580,22 ± 8,27 ^a	547,48 ± 46,73 ^a	524,94 ± 17,78 ^a			
Lisina	443,16 ± 39,48	439,56 ± 5,72 ^a	438,86 ± 6,32 ^a	418,23 ± 30,38 ^a	399,10 ± 10,35 ^a			
Metionina	140,31 ± 14,60	125,99 ± 2,04 ^a	142,17 ± 2,23 ^b	118,65 ± 11,17 ^a	129,62 ± 3,89 ^{ab}			
Ornitina	20,55 ± 3,68	91,65 ± 2,81 ^a	13,60 ± 0,56 ^b	91,27 ± 21,40 ^a	10,21 ± 0,69 ^b			
Serina	329,76 ± 36,80	252,53 ± 4,51 ^a	207,62 ± 4,21 ^c	217,25 ± 19,39 ^{bc}	236,62 ± 7,52 ^{ab}			
Treonina	206,28 ± 21,12	188,53 ± 3,24 ^a	172,05 ± 3,83 ^b	196,15 ± 17,16 ^a	164,62 ± 5,43 ^b			
Valina	293,50 ± 30,79	269,56 ± 4,81 ^a	279,31 ± 6,55 ^a	263,05 ± 22,16 ^a	254,39 ± 8,41 ^a			

Tabla III-14. Concentraciones de aminoácidos en los sobrenadantes de los cultivos de la cepa **MG1363** bajo las 4 condiciones estudiadas.

*Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los valores de concentración.

MGΔargR

	Concentración inicial (mg/L)	Con Arg y 0% etanol	Sin Arg y 0% etanol	Con Arg y 2% etanol	Sin Arg y 2% etanol
		Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento	Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento	Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento	Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento
Alanina	268,62 ± 41,65	219,67 ± 52,81 ^a	226,70 ± 27,39 ^a	190,86 ± 12,68 ^a	240,97 ± 22,10 ^a
Arginina	150,27 ± 43,93	41,57 ± 3,21 ^a	30,96 ± 8,52 ^{ab}	29,65 ± 3,39 ^b	26,01 ± 2,37 ^b
Asparagina	311,58 ± 36,23	230,76 ± 53,62 ^a	199,96 ± 13,58 ^a	200,59 ± 14,31 ^a	213,32 ± 19,60 ^a
Fenilalanina	347,45 ± 54,80	335,64 ± 57,00 ^a	336,14 ± 26,00 ^a	278,71 ± 13,91 ^a	351,90 ± 18,86 ^a
Glicina	307,03 ± 66,16	257,90 ± 5,32 ^a	237,84 ± 32,83 ^a	224,71 ± 10,29 ^a	245,99 ± 28,51 ^a
Isoleucina	312,35 ± 58,56	250,68 ± 56,99 ^a	228,67 ± 12,53 ^a	197,17 ± 8,96 ^a	246,93 ± 28,67 ^a
Leucina	772,34 ± 128,72	590,89 ± 30,55 ^a	586,54 ± 37,96 ^a	532,38 ± 25,73 ^a	607,82 ± 21,99 ^a
Lisina	528,55 ± 83,98	385,62 ± 18,22 ^a	447,49 ± 31,22 ^{ab}	362,38 ± 25,26 ^a	550,40 ± 36,27 ^b
Metionina	171,14 ± 50,50	162,82 ± 55,59 ^a	152,63 ± 15,32 ^a	121,89 ± 7,34 ^a	156,02 ± 17,58 ^a
Ornitina	12,69 ± 1,19	64,82 ± 4,61 ^a	19,29 ± 1,27 ^b	122,17 ± 6,61 ^c	18,99 ± 1,88 ^b
Serina	391,60 ± 60,26	261,01 ± 52,14 ^a	254,21 ± 16,79 ^a	221,32 ± 12,65 ^a	272,64 ± 30,83 ^a
Treonina	268,76 ± 38,03	141,02 ± 31,43 ^a	169,05 ± 18,05 ^a	146,06 ± 33,36 ^a	301,92 ± 32,42 ^b
Valina	345,63 ± 65,30	294,17 ± 99,65 ^a	317,73 ± 22,61 ^a	254,55 ± 14,30 ^a	313,77 ± 8,87 ^a

Tabla III-15. Concentraciones de aminoácidos en los sobrenadantes de los cultivos de la cepa **MGΔargR** bajo las 4 condiciones estudiadas

*Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los valores de concentración.

MGΔahrC	Con Arg y 0% etanol		Sin Arg y 0% etanol		Con Arg y 2% etanol		Sin Arg y 2% etanol	
	Concentración inicial (mg/L)	Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento	Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento	Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento	Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento	Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento	Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento	
Alanina	218,81 ± 9,57	190,00 ± 28,22 ^a	255,36 ± 27,25 ^a	119,63 ± 13,91 ^b	119,56 ± 11,12 ^b			
Arginina	160,88 ± 76,05	100,56 ± 8,66 ^a	15,75 ± 2,91 ^c	77,11 ± 4,85 ^b	13,41 ± 0,89 ^c			
Asparagina	240,51 ± 12,81	210,81 ± 26,59 ^{ab}	244,92 ± 5,00 ^a	154,93 ± 11,80 ^c	162,37 ± 14,91 ^{bc}			
Fenilalanina	295,16 ± 11,08	315,33 ± 23,37 ^{ab}	359,42 ± 20,18 ^a	233,20 ± 9,55 ^c	237,61 ± 19,95 ^{bc}			
Glicina	218,44 ± 18,80	228,15 ± 36,96 ^a	291,81 ± 19,08 ^a	206,05 ± 4,85 ^a	228,03 ± 13,58 ^a			
Isoleucina	216,99 ± 20,40	186,78 ± 21,69 ^a	238,04 ± 24,65 ^a	131,14 ± 9,54 ^b	134,80 ± 13,22 ^b			
Leucina	579,60 ± 25,62	546,90 ± 67,93 ^a	619,01 ± 21,63 ^a	359,63 ± 29,36 ^b	367,62 ± 38,07 ^b			
Lisina	439,32 ± 38,99	481,45 ± 40,94 ^a	446,01 ± 24,27 ^a	255,24 ± 31,99 ^b	233,27 ± 33,24 ^b			
Metionina	134,72 ± 4,32	138,78 ± 14,31 ^{ab}	169,50 ± 50,49 ^a	90,18 ± 6,70 ^c	90,49 ± 8,06 ^{bc}			
Ornitina	10,31 ± 0,54	12,78 ± 1,45 ^a	13,28 ± 0,42 ^a	7,66 ± 0,56 ^b	7,50 ± 0,92 ^b			
Serina	284,15 ± 18,41	247,85 ± 29,19 ^a	276,07 ± 15,11 ^a	183,04 ± 14,34 ^b	181,61 ± 19,41 ^b			
Treonina	183,54 ± 15,80	176,92 ± 19,10 ^{ab}	216,18 ± 23,53 ^a	131,15 ± 19,49 ^b	117,91 ± 11,03 ^b			
Valina	289,78 ± 23,20	293,75 ± 34,38 ^a	345,94 ± 39,14 ^a	184,06 ± 13,40 ^{bc}	165,30 ± 8,05 ^c			

Tabla III-16. Concentraciones de aminoácidos en los sobrenadantes de los cultivos de la cepa **MGΔahrC** bajo las 4 condiciones estudiadas.

*Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los valores de concentración.

MGΔargR ΔahrC	Concentración inicial (mg/L)	Con Arg y 0% etanol	Sin Arg y 0% etanol	Con Arg y 2% etanol	Sin Arg y 2% etanol
		Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento	Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento	Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento	Concentración media (mg/L) en la fase estacionaria de crecimiento
Alanina	231,56 ± 13,53	178,88 ± 11,74 ^a	169,68 ± 13,21 ^a	215,29 ± 13,68 ^b	121,01 ± 6,96 ^c
Arginina	58,50 ± 15,92	17,78 ± 2,12 ^a	7,34 ± 0,91 ^b	22,04 ± 0,91 ^c	3,92 ± 0,14 ^b
Asparagina	274,34 ± 17,23	229,70 ± 7,85 ^a	200,68 ± 11,94 ^b	242,88 ± 20,28 ^a	153,96 ± 9,52 ^c
Fenilalanina	293,40 ± 12,91	275,09 ± 8,51 ^a	283,41 ± 12,25 ^a	271,10 ± 26,34 ^a	219,48 ± 12,46 ^b
Glicina	215,87 ± 21,55	184,92 ± 7,22 ^a	222,61 ± 6,21 ^b	178,27 ± 23,99 ^a	208,10 ± 9,20 ^{ab}
Isoleucina	219,87 ± 8,49	178,88 ± 5,60 ^a	178,50 ± 16,01 ^a	181,42 ± 33,60 ^a	128,36 ± 7,72 ^b
Leucina	602,77 ± 26,66	530,80 ± 16,35 ^a	468,32 ± 10,29 ^a	561,16 ± 12,34 ^a	355,35 ± 22,75 ^b
Lisina	462,06 ± 18,94	371,98 ± 22,08 ^a	357,47 ± 12,30 ^a	454,02 ± 34,41 ^b	240,36 ± 18,26 ^c
Metionina	151,65 ± 13,30	140,82 ± 4,16 ^a	130,55 ± 13,90 ^a	131,88 ± 24,67 ^a	93,80 ± 5,45 ^b
Ornitina	12,31 ± 4,01	17,90 ± 2,55 ^a	18,47 ± 0,33 ^a	16,27 ± 4,11 ^a	20,35 ± 1,01 ^a
Serina	293,70 ± 11,98	224,42 ± 7,71 ^{ab}	190,76 ± 17,57 ^{ab}	266,12 ± 7,09 ^c	162,77 ± 10,85 ^b
Treonina	204,17 ± 12,26	190,89 ± 6,23 ^a	125,68 ± 21,64 ^{bc}	196,34 ± 8,61 ^{ab}	112,09 ± 7,02 ^c
Valina	302,70 ± 17,25	283,06 ± 6,23 ^a	219,89 ± 9,56 ^b	273,01 ± 57,53 ^{ab}	168,20 ± 12,22 ^c

Tabla III-17. Concentraciones de aminoácidos en los sobrenadantes de los cultivos de la cepa **MGΔargRΔahrC** bajo las 4 condiciones estudiadas.

*Las diferentes letras indican diferencias significativas entre los valores de concentración.

Respecto al análisis de las aminas biógenas: agmatina, espermidina, feniletilamina, histamina y putrescina, sólo aparecieron los picos correspondientes a la espermidina, según se muestra en la **Tabla III-18**.

Tabla III-18. Resultados del análisis de aminas biógenas para la cepa wild type y sus tres mutantes con los 4 tratamientos ensayados: 1) Con 2,5 mg/ml Arg y sin etanol; 2) Sin Arg y sin etanol; 3) Con 2,5 mg/ml Arg y con 2 % etanol; 4: Sin Arg y con 2 % etanol.

Cepa	Tratamiento	Agmatina (mg/L)	Feniletil-amina (mg/L)	Histamina (mg/L)	Putrescina (mg/L)	Espermidina (mg/L)
MG1363	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
MGΔargR	1	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
MGΔahrC	1	-	-	-	-	47,40 \pm 8,52
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	61,28 \pm 18,97
	4	-	-	-	-	-
MGΔargR ΔahrC	1	-	-	-	-	55,54 \pm 1,42
	2	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	49,75 \pm 12,40
	4	-	-	-	-	-

No se detectaron para ninguna de las cepas las aminas biógenas agmatina ni putrescina (derivadas del metabolismo de la arginina). Tampoco se detectó la feniletilamina generada por descarboxilación de la fenilalanina, ni tampoco histamina, generada a partir del aminoácido histidina a través de la enzima histidina descarboxilasa.

En las muestras resultantes de la incubación de la cepa MG1363 (wild type) en el medio CDM con histidina, tampoco se detectó la amina biógena histamina tanto en ausencia como en presencia de etanol. Por lo tanto la cepa MG1363 no genera histamina cuando el aminoácido necesario para su formación (histidina) está presente en el medio de cultivo.

En nuestro estudio detectamos la generación de espermidina en los cultivos en medio con arginina de los dos mutantes que no poseen la ruta ADI activa, por lo cual la generación de espermidina sería debida a la utilización de la agmatina a través de la ruta AGDI (**Figura III-60**). A partir de la arginina se genera la agmatina que derivará en espermidina, previo paso por putrescina. En ningún caso se detectaron los compuestos intermediarios putrescina ni agmatina. La generación de putrescina ha sido descrita anteriormente en la bibliografía para *Lactococcus lactis* (Ladero *et al.*, 2011, Linares *et al.*, 2013, del Rio *et al.*, 2015). En nuestro caso toda la putrescina seguiría la ruta de generación de espermidina.

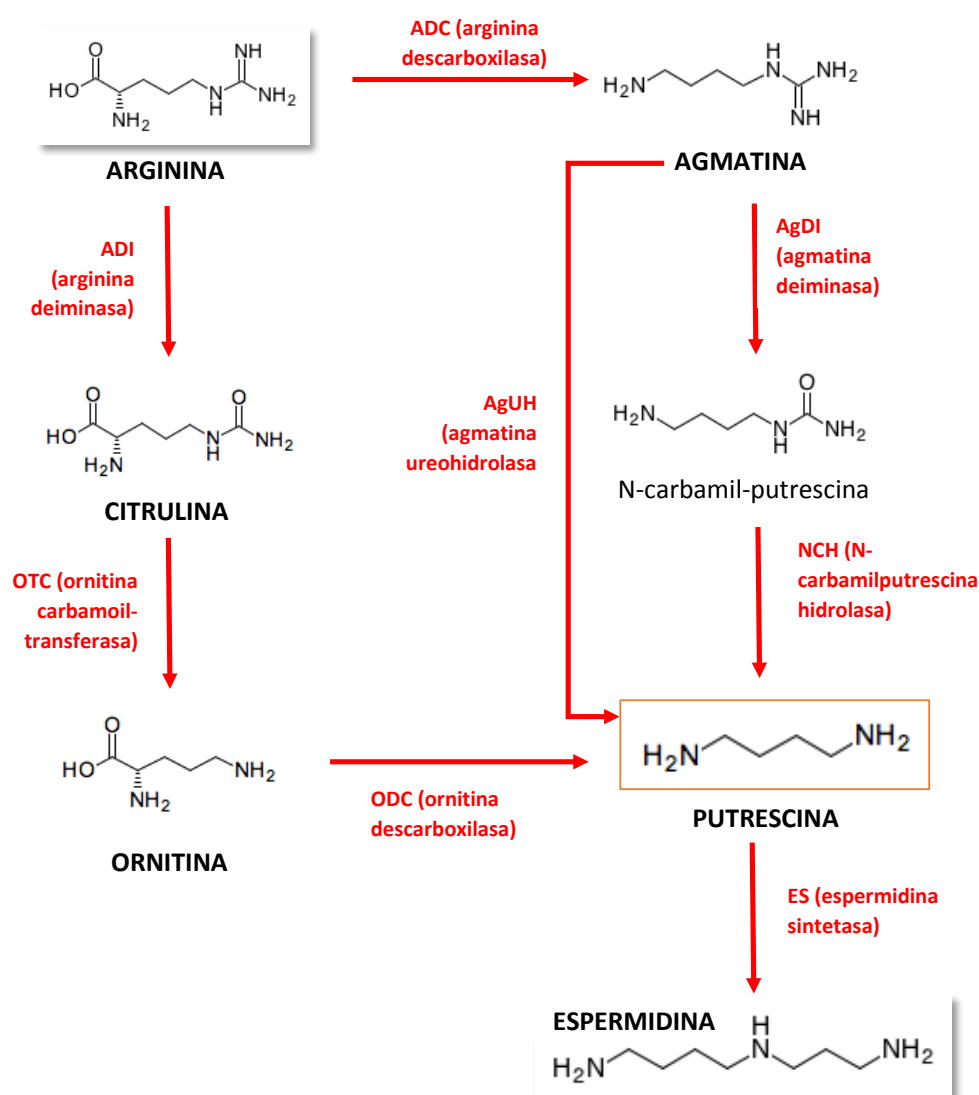
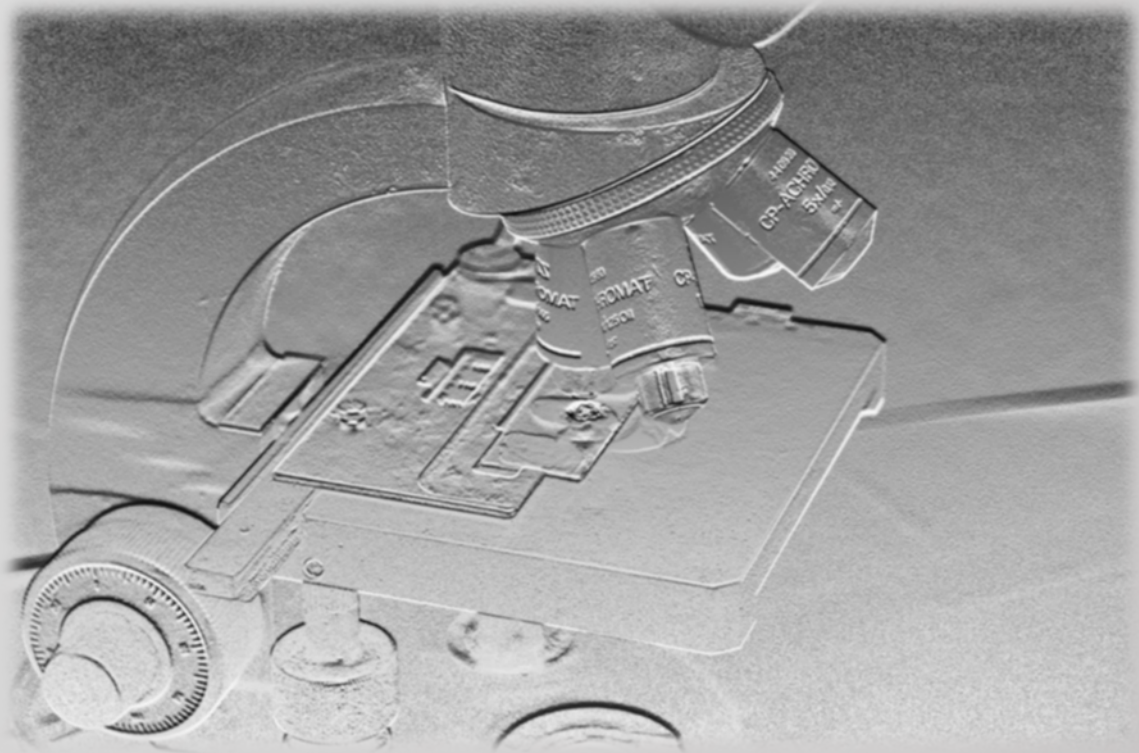


Figura III-60. Rutas de generación de putrescina y espermidina por *L. lactis* MG1363 a partir del aminoácido arginina por dos vías (vía ADI y vía AgDI) (http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?llm00330).

En la industria enológica las BL llevan a cabo la fermentación maloláctica, tal y como se ha indicado en el capítulo de Introducción, y especialmente la especie *O. oeni* tiene un papel relevante. Esta especie posee los genes *arc* codificantes de las enzimas necesarias para degradar la arginina a través de la ruta ADI (Araque *et al.*, 2009), y por tanto la presencia de arginina en el medio puede proporcionar un mecanismo de resistencia a la presencia de etanol en el medio enológico para *O. oeni*, y trabajos de Bourdineaud (2006) así lo indicaban. Sin embargo, otros estudios posteriores (Terrade & Mira de Orduña, 2009) mostraban que la presencia de arginina no estimula el crecimiento de *O. oeni* en el vino en condiciones estándar para la fermentación maloláctica. Nuestros estudios indican que la arginina, igual que la presencia de azúcares, puede proporcionar energía para el crecimiento de estas bacterias y favorecer su resistencia al etanol.

En resumen, nuestro estudio indica que *L. lactis*, BL modelo que posee los genes de la ruta ADI de degradación de la arginina, puede utilizar esta ruta cuando se encuentra en presencia de etanol en el medio de cultivo y hay arginina disponible; y no genera histamina ni las aminas biógenas agmatina, espermidina, ni putrescina. Según la revisión bibliográfica realizada, este estudio es el primero sobre la respuesta del metabolismo aminoacídico de *L. lactis* a la presencia de etanol en su medio de crecimiento y demuestra que la ruta ADI de degradación de la arginina es utilizada como mecanismo de respuesta de esta BL al etanol.



Conclusiones

Conclusions

CONCLUSIONES

1. El método rápido, eficaz y preciso para la cuantificación de la población de BA viables en vinagres durante el proceso de acetificación por el método sumergido, es el de microscopía de fluorescencia empleando la tinción con los fluoróforos: yoduro de propidio y Syto 9. Este método resultó adecuado también para el recuento de bacterias lácticas tanto en condiciones de laboratorio como en bodega.

2. Se realizó la identificación taxonómica a nivel de especie de 90 aislados de vinagres de vinos, sidras y alcohol etílico, en plena fermentación por el método sumergido, resultando *Ga. europaeus* la especie predominante que lideró los procesos de acetificación.

3. Se realizó la identificación a nivel de especie y a nivel clonal, y se obtuvieron 43 cepas de bacterias acéticas distintas responsables de la elaboración de vinagres por el método sumergido. Los clones *Ga. europaeus* R1 y R33d aparecieron como cultivos puros en vinagres de alcohol y R1 apareció en cultivo puro y en mixtos en el 56 % de las muestras de vinagres estudiadas. Estos clones *Ga. europaeus* constituirían excelentes candidatos para la selección de cultivos iniciadores para la elaboración de este tipo de vinagres.

4. El método de análisis de restricción del DNA genómico con la enzima *SpeI* y PFGE es el método adecuado para estudiar y clasificar cepas de BA. El método rápido ERIC-PCR es un método apropiado para el seguimiento de una cepa específica de BA previamente caracterizada y que se desee seguir su implantación en un proceso de acetificación.

5. De las 69 cepas de BL enológicas estudiadas de 10 especies distintas, únicamente 4 cepas (5,8 %) dieron positivo en el análisis de la capacidad de formar biofilm, siendo la especie *L. mesenteroides* la que generaba mayor cantidad de biofilm.

6. Las BL formadoras de biofilm en su forma planctónica presentaron una cierta resistencia al etanol, creciendo y generando biofilm en un medio con 6 % de etanol (v/v), siendo *O. oeni* la más resistente al etanol y creciendo con 12 % de etanol.

7. Las BL crecidas en forma de biofilm presentan una mayor resistencia al etanol que en su forma planctónica, y generan aún más biofilm al adicionar medio con concentraciones crecientes de etanol, dentro del rango de 2 a 10 % etanol (v/v), siendo *O. oeni* la más resistente y engrosando su biofilm tras la adición de medio con 12 % etanol.

8. Se consiguió un extracto activo que inhibía el crecimiento del 83,5 % de la colección de BL enológicas, a partir del sobrenadante libre de células de la bacteria productora de nisina *Lactococcus lactis* LM29 (estatus QPS), extracto en cuya composición se incluían entre otros: 60 % mosto de uva blanca y 200 µg/ml equivalentes de nisina.

9. La nisina en la concentración subinhibitoria de 6 µg/ml y en combinación con 6 % etanol impidió la generación de biofilms de las BL formadoras cuando éstas se encontraban en forma planctónica, produciéndose una inhibición del crecimiento celular y de la formación del biofilm. Sin embargo, cuando las BL estaban en forma de biofilm, la nisina en concentración subinhibitoria potenció el efecto activador del etanol y las BL generaron más biofilm.

10. La nisina en la concentración de 200 µg/ml, inhibidora del crecimiento de las BL, impidió la formación del biofilm de BL cuando éstas se encontraban en forma planctónica. Cuando las BL estaban formando un biofilm, 200 µg/ml de nisina impidió el aumento del biofilm y contrarrestó el efecto activador de la formación de más biofilm ejercido por bajas concentraciones de etanol.

11. Respecto al metabolismo de los aminoácidos de *L. lactis* en presencia de 2 % etanol en el medio de cultivo, cuando tiene disponible arginina, utiliza la vía de degradación ADI de este aminoácido como mecanismo de respuesta a la presencia del etanol en el medio, generando el aminoácido ornitina y el ion amonio.

12. *L. lactis* en presencia de 2 % etanol en el medio de cultivo utiliza además de la arginina, los aminoácidos Gly y Ser. Cuando no dispone de arginina en el medio de cultivo y está en presencia de 2% etanol, el aminoácido que utiliza preferentemente es la Gly.

13. *L. lactis* no generó ninguna amina biógena (agmatina, espermidina, feniletilamina, histamina, ni putrescina) ni en presencia ni en ausencia de etanol en el medio de cultivo.

CONCLUSIONS

1. The rapid, efficient and accurate method for quantification of viable acetic acid bacteria (AAB) populations in vinegars during the acetification process by the submerged method, is fluorescence microscopy with the fluorescent stains: propidium iodide and Syto 9. This method was also suitable for counting lactic acid bacteria (LAB) under both laboratory and winery conditions.

2. The taxonomic identification at species level was performed for 90 isolates from vinegars of wines, ciders and ethanol in submerged full fermentation, and showed *Ga. europaeus* as the predominant species, which led the acetification processes.

3. Identification at species and clonal levels rendered 43 AAB strains responsible for vinegar production by the submerged method. *Ga. europaeus* strains R1 and R33d appeared as pure cultures in ethanol vinegars and R1 appeared in pure and mixed cultures in 56 % of the studied vinegar samples. These *Ga. europaeus* strains could become excellent starters for the elaboration of this type of vinegars.

4. Restriction analysis with *SpeI* and PFGE is an appropriate method for studying and characterising AAB strains. The rapid ERIC-PCR method is appropriate for monitoring a previously characterized AAB strain and to determine its implantation in acetic fermentations.

5. Only 4 strains (5.8 %) out of the 69 studied oenological LAB strains, which included 10 species, gave positive results in the biofilm-forming screening, and the species *L. mesenteroides* showed the highest biofilm formation.

6. The biofilm-forming LAB strains in their planktonic form showed moderate ethanol resistance, they grew and formed biofilms in a broth containing 6 % ethanol (v/v). *O. oeni* showed the highest ethanol resistance and grew in a broth containing 12 % ethanol.

7. LAB in biofilm form showed higher ethanol resistance than in the planktonic form, and they generated more biofilm when fresh medium containing ethanol in the concentration range 2-10 % (v/v) was added. *O. oeni* showed the highest resistance and increased its biofilm after addition of 12 % ethanol.

8. An active extract was obtained, which inhibited the bacterial growth of 83.5 % of the oenological LAB collection. It was obtained from the cell-free supernatant of the nisin producer *Lactococcus lactis* LM29 (QPS status) culture. The extract composition included 60 % white grape must and 200 µg/ml of nisin equivalent.

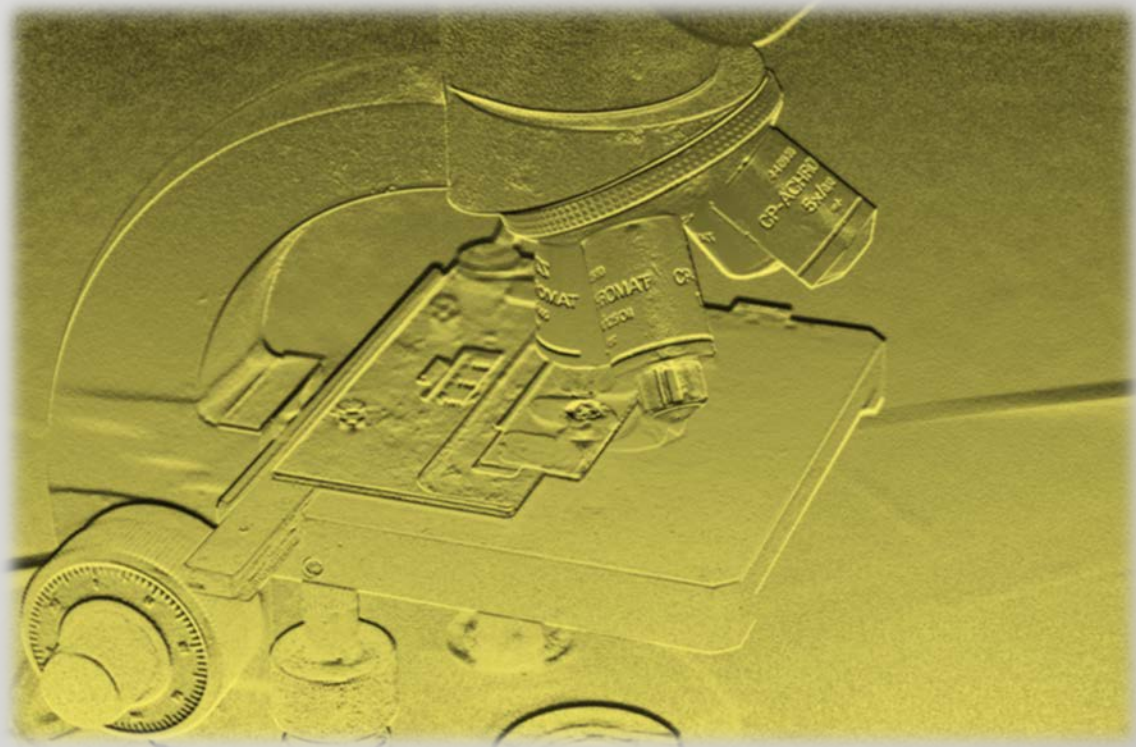
9. The nisin subinhibitory concentration of 6 µg/ml added in combination with 6 % ethanol onto planktonic cells of biofilm-forming LAB strains, prevented the biofilm formation and inhibited bacterial growth. Nevertheless, when LAB strains were forming a biofilm, the subinhibitory concentration of nisin boosted the activating effect of ethanol and LAB generated more biofilm.

10. The growth inhibitory concentration of 200 µg/ml nisin added onto planktonic cells of biofilm-forming LAB strains, prevented biofilm formation. When LAB strains were forming a biofilm, 200 µg/ml nisin prevented the biofilm to increase, and opposed the activating effect of ethanol on the generation of biofilm.

11. Regarding the amino acid metabolism of *L. lactis* in presence of 2 % ethanol in the culture broth, when arginine is available *L. lactis* utilizes the ADI pathway of arginine degradation as a mechanism of response to the presence of ethanol, and it generates ornithine and ammonium.

12. *L. lactis* in the presence of 2 % ethanol in the culture broth utilizes Gly and Ser in addition to arginine. When arginine is not available, Gly is the preferably used amino acid in presence of 2 % ethanol.

13. *L. lactis* did not generate any biogenic amine (agmatine, spermidine, phenylethylamine, histamine, or putrescine) either in presence or in absence of ethanol in the culture broth.



Bibliografía

Bibliography

BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY

- Abdallah, F. B., Chaieb, K., Zmantar, T., Kallel, H., Bakhrouf, A.** 2009. Adherence assays and slime production of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Braz. J. Microbiol.* 40(2): 394–398.
- Adamberg, K., Seiman, A., Vilu, R.** 2012. Increased biomass yield of *Lactococcus lactis* by reduced overconsumption of amino acids and increased catalytic activities of enzymes. *PLoS One.* 7(10): e48223.
- Akasaka, N., Ishii, Y., Hidese, R., Sakoda, H., Fujiwara, S.** 2014. Enhanced production of branched-chain amino acids by *Gluconacetobacter europaeus* with a specific regional deletion in a leucine responsive regulator. *J. Biosci. Bioeng.* 118(6): 607-15.
- Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J.M., Esteve-Zarzoso, B.** 2008. Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiol.* 25: 849–856.
- Andrés-Barrao, C., Benaglib, C., Chappuisa, M., Ortega, R., Tonolla, M., Barja, F.** 2013. Rapid identification of acetic acid bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting. *Syst. Appl. Microbiol.* 36: 75-81.
- Araque, I., Gil, J., Carreté, R., Bordons, A., Reguant, C.** 2009. Detection of *arc* genes related with the ethyl carbamate precursors in wine lactic acid bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 57: 1841-7.
- Araque, I., Reguant, C., Rozès, N., Bordons, A.** 2011. Influence of wine-like conditions on arginine utilization by lactic acid bacteria. *Int. Microbiol.* 14: 225-2339.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., Wouters, J.T.M., Smit, G.** 2002. Antimicrobial-producing wild lactococci isolated from artisanal and non-dairy origins. *Int. Dairy J.* 12: 145-150.
- Badel, S., Bernardi, T., Michaud, P.** 2011. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 29(1): 54-66.
- Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Cantero-Moreno, D., Barja, F., García-García, I.** 2006. Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. *Process Biochem.* 41: 1160-1164.
- Barefoot, S.F. & Nettles, C.G.** 1993. Antibiosis revisited: bacteriocins produced by dairy starter cultures. *J. Dairy Sci.* 76(8): 2366-79.
- Bartowsky, E.J., Xia, D., Gibson, R.L., Fleet, G.H., Henschke, P.A.** 2003. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 36: 307-314.
- Bartowsky, E.J. & Henschke, P.A.** 2008. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine; a review. *Int. J. Food Microbiol.* 125: 60-70.
- Bartowsky, E.J.** 2009. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Lett. Appl. Microbiol.* 48(2): 149-56.

- Beasley, S.S., Saris, P.E.** 2004. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(8): 5051-3.
- Benagli, C., Rossi, V., Dolina, M., Tonolla, M., Petrini, O.** 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS ONE* 6 (1), e16424.
- Benmechernene, Z., Fernandez-No I, Kihal, M., Böhme, K., Calo-Mata, P., Barros-Velazquez, J.** 2013. Recent patents on bacteriocins: food and biomedical applications. *Recent Pat DNA Gene Seq.* 7(1): 66-73.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W.** 2009. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 7 (Database issue: D26-31.)
- Boesch, C., Trcek, J., Sievers, M., Teuber, M.** 1998. *Acetobacter intermedius* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 21: 220-229.
- Bordas, M., Araque, I., Alegret, J.O., El Khoury, M., Lucas, P., Rozès, N., Reguant, C., Bordons, A.** 2013. Isolation, selection, and characterization of highly ethanol-tolerant strains of *Oenococcus oeni* from south Catalonia. *Int. Microbiol.* 16(2): 113-23.
- Bordons, A. & Reguant, C.** 2013. Bioquímica de las bacterias lácticas del vino y la fermentación maloláctica. *Revista SEBBM*, nº13, Junio 2013. Rubes Editorial, S.L.
- Bourdineaud, J.P., Nehmé, B., Tesse, S., Lonvaud-Funel, A.** 2003. The *ftsH* gene of the wine bacterium *Oenococcus oeni* is involved in protection against environmental stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(5): 2512-20.
- Bourdineaud, J.P., Nehmé, B., Tesse, S., Lonvaud-Funel, A.** 2004. A bacterial gene homologous to ABC transporters protect *Oenococcus oeni* from ethanol and other stress factors in wine. *Int. J. Food Microbiol.* 92(1): 1-14.
- Bourdineaud, J.P.** 2006. Both arginine and fructose stimulate pH-independent resistance in the wine bacteria *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.* 107(3): 274-80.
- Bove, P., Capozzi, V., Garofalo, C., Rieu, A., Spano, G., Fiocco, D.** 2012. Inactivation of the *ftsH* gene of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: effects on growth, stress tolerance, cell surface properties and biofilm formation. *Microbiol. Res.* 167(4): 187-93.
- Boziaris, I.S. & Adams, M.R.** 1999. Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of gram negatives. *Int. J. Food Microbiol.* 53(2-3): 105-13.
- Boziaris, I.S. & Adams, M.R.** 2000. Transient sensitivity to nisin in cold-shocked Gram negatives. *Lett. Appl. Microbiol.* 31(3): 233-7.
- Boziaris, I.S. & Adams, M.R.** 2001. Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives. *J. Appl. Microbiol.* 91(4): 715-24.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., Kolter, R.** 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 13(1): 20-6.
- Brandsma, J.B., van de Kraats, I., Abee, T., Zwietering, M.H., Meijer, W.C.** 2012. Arginine metabolism in sugar deprived *Lactococcus lactis* enhances survival and cellular activity, while supporting flavor production. *Food Microbiol.* 29: 27-32

- Brewer, R., Adams, M.R., Park, S.F.** 2002. Enhanced inactivation of *Listeria monocytogenes* by nisin in the presence of ethanol. *Lett. Appl. Microbiol.* 34(1): 18-21.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Dubois-Brissonnet, F.** 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling.* 27(9): 1017-32.
- Brötz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Götz, F., Bierbaum, G., Sahl, H.G.** 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol Microbiol.* 30(2): 317-27.
- Brown, M.L., Aldrich, H.C., Gauthier, J. J.** 1995. Relationship between glycocalyx and povidone-iodine resistance in *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 187-193.
- Budak, N.H., Aykin, E., Seydim, A.C., Greene, A.K., Guzel-Seydim, Z.B.** 2014. Functional properties of vinegar. *J. Food Sci.* 79(5): R757-64.
- Budin-Verneuil, A., Pichereau, V., Auffray, Y., Ehrlich, D., Maguin, E.** 2007. Proteome phenotyping of acid stress-resistant mutants of *Lactococcus lactis* MG1363. *Proteomics.* 7(12): 2038-46.
- Cafaro, C., Bonomo, M.G., Salzano, G.** 2014. Adaptive changes in geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene expression level under ethanol stress conditions in *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* 116(1): 71-80.
- Callejón, R.M., Tesfaye, W., Torija, M.J., Mas, A., Troncoso, A.M., Morales, M.L.** 2008. HPLC determination of amino acids with AQC derivatization in vinegars along submerged and surface acetifications and its relation to the microbiota. *Eur. Food Res. Technol.* 227: 93–102.
- Camu, N., De Winter T., Verbrugge K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J.S., Vancanneyt, M., De Vuyst, L.** 2007. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1809-1824.
- Carvalho, A.L., Cardoso, F.S., Bohn, A., Neves, A.R., Santos, H.** 2011. Engineering trehalose synthesis in *Lactococcus lactis* for improved stress tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 4189-4199.
- Chatterjee, S., Chatterjee, S., Lad, S.J., Phansalkar, M.S., Rupp, R.H., Ganguli, B.N., Fehlhaber, H.W., Kogler, H.** 1992. Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. Fermentation, isolation, purification and chemical characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 45(6): 832-8.
- Cheigh, CI & Pyun Y.R.** 2005. Nisin biosynthesis and its properties. *Biotechnol. Lett.* 27(21): 1641-8.
- Chu-Ky, S., Tourdot-Marechal, R., Marechal, P.A., Guzzo, J.** 2005. Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochim. Biophys. Acta.* 1717(2): 118-24.
- Chun, W. & Hancock, R.E.** 2000. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 60(1): 25-32.

- Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D., Swings, J.** 2002. Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1551-1558.
- Cleenwerck, I. & De Vos, P.** 2008. Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: an overview of the currently applied methodology. *Int. J. Food Microbiol.* 125: 2-14.
- Cleenwerck, I., de Wachter, M., Gonzalez, A., de Vuyst, L., de Vos, P.** 2009. Differentiation of species of the family *Acetobacteraceae* by AFLP DNA fingerprinting: *Gluconacetobacter kombuchae* is a later heterotypic synonym of *Gluconacetobacter hansenii*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 1771-1786.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284(5418): 1318-22.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P.** 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(10): 777-88.
- Cretenet, M., Laroute, V., Ulvé, V., Jeanson, S., Nouaille, S., Even, S., Piot, M., Girbal, L., Le Loir, Y., Loubière, P., Lortal, S., Coccagn-Bousquet, M.** 2011. Dynamic analysis of the *Lactococcus lactis* transcriptome in cheeses made from milk concentrated by ultrafiltration reveals multiple strategies of adaptation to stresses. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(1): 247-57.
- Crow, V.L. & Thomas, T.D.** 1982. Arginine metabolism in lactic streptococci. *J. Bacteriol.* 150: 1024-32.
- Daeschel, M.A., Jung, D.S., Watson, B.T.** 1991. Controlling Wine Malolactic Fermentation with Nisin and Nisin-Resistant Strains of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(2): 601-3.
- Davey, M.E. & O'Toole, G.A.** 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4): 847-67.
- de Ruyter, P.G., Kuipers, O.P., de Vos, W.M.** 1996. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3662-3667.
- De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S., Giudici, P.** 2006. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiol.* 23: 809-813.
- De Vero, L. & Giudici, P.** 2008. Genus-specific profile of acetic acid bacteria by 16S rDNA PCR-DGGE. *Int. J. Food Microbiol.* 125: 96-101.
- de Vos, W.M., Mulders, J.W., Siezen, R.J., Hugenholtz, J., Kuipers, O.P.** 1993. Properties of nisin Z and distribution of its gene, *nisZ*, in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(1): 213-8.
- De Vuyst, L. & Vandamme E.J.** 1994a. Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance, En: *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*, London, p.1-11.
- De Vuyst, L. & Vandamme, E.J.** 1994b. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. En: *Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and application*. De Vuyst, L. y Vandamme, E.J. (eds.). pp. 91-142. Chapman & Hall, Ltd. London.

- De Vuyst, L., Camu, N., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., Van de Perre, V., Vancanneyt, M., De Vos, P., Cleenwerck, I.** 2008. Validation of the (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *Int. J. Food Microbiol.* 125: 79-90.
- Del Campo, G., Berregi, I., Santos, J.I., Dueñas, M., Irastorza, A.** 2008. Development of alcoholic and malolactic fermentations in highly acidic and phenolic apple musts. *Bioresour. Technol.* 99: 2857-2863.
- del Rio, B., Linares, D.M., Ladero, V., Redruello, B., Fernández, M., Martín, M.C., Alvarez, M.A.** 2015. Putrescine production via the agmatine deiminase pathway increases the growth of *Lactococcus lactis* and causes the alkalization of the culture medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99(2): 897-905.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J.** 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Anton. Leeuw.* 69(2): 193-202.
- Diep, D.B. & Nes, I.F.** 2002. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr. Drug. Targets.* 3(2): 107-22.
- Díez, L., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., Rodríguez, J.M., Torres, C., Ruiz-Larrea, F.** 2012. Antimicrobial activity of pediocin PA-1 against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *Food Microbiol.* 31(2): 167-172.
- Díez, L., Solopova, A., Fernández, R., González, M., Tenorio, C., Kuipers, O.P., Ruiz-Larrea, F.** 2015. Transcriptome analysis shows activation of the arginine deiminase pathway in *Lactococcus lactis* as a direct response to ethanol stress. *Applied and Environmental Microbiology*, en revisión.
- Dimopoulou, M., Hazo, L., Dols-Lafargue, M.** 2012. Exploration of phenomena contributing to the diversity of *Oenococcus oeni* exopolysaccharides. *Int. J. Food Microbiol.* 153: 114-122.
- Dimopoulou, M., Vuillemin, M, Campbell-Sills, H., Lucas, P.M., Ballestra, P., Miot-Sertier, C., Favier, M., Coulon, J., Moine, V., Doco, T., Roques, M., Williams, P., Petrel, M., Gontier, E., Moulis, C., Remaud-Simeon, M., Dols-Lafargue, M.** 2014. Exopolysaccharide (EPS) synthesis by *Oenococcus oeni*: from genes to phenotypes. *PLoS One.* 9(6): e98898.
- Dols-Lafargue, M., Gindreau, E., Le Marrec, C., Chambat, G., Heyraud, A., Lonvaud-Funel, A.** 2007. Changes in red wine soluble polysaccharide composition induced by malolactic fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 55(23): 9592-9.
- Dols-Lafargue, M., Lee, H.Y., Le Marrec, C., Heyraud, A., Chambat, G., Lonvaud-Funel, A.** 2008. Characterization of *gtf*, a glucosyltransferase gene in the genomes of *Pediococcus parvulus* and *Oenococcus oeni*, two bacterial species commonly found in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(13): 4079-90.
- Dong, L., Tong, Z., Linghu, D., Lin, Y., Tao, R., Liu, J., Tian, Y., Ni, L.** 2012. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 39(5): 390-5.
- Donlan, R.M.** 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8(9): 881-890. Centers for Disease Control and Prevention.

- Dorrian, J.M., Briggs, D.A., Ridley, M.L., Layfield, R., Kerr, I.D.** 2011. Induction of a stress response in *Lactococcus lactis* is associated with a resistance to ribosomally active antibiotics. *FEBS Journal*. 21: 4015-4024.
- Drysdale, G.S. & Fleet, G.H.** 1985. Acetic acid bacteria in some Australian wines. *Food Technol. Aust.* 37: 17–20.
- Du Troit, W.J. & Lambrechts, M.G.** 2002. The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 74: 57-64.
- Dunne, W.M.** 2002. Review. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 155-166.
- Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Hammelmann, M., Entian, K.D.** 1992. Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the NisB protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(11): 3730-43.
- Epstein, A.K., Pokroy, B., Seminara, A., Aizenberg, J.** 2011. Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108(3): 995-1000.
- Fernández, M. & Zúñiga, M.** 2006. Amino Acid Catabolic Pathways of Lactic Acid Bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 32: 155–183.
- Flanzy, C.** 2000. *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. Madrid. Editan: A. Madrid Vicente y Mundi-Prensa.
- Franke, I. H., Fegan, M., Hayward, C., Leonard, G., Stackebrandt, E., Sly, L.I.** 1999. Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1681-1693.
- Franke-Whittle, I.H., O’Shea, M.G., Leonard, G.J., Sly, L.I.** 2005. Design, development, and use of molecular primers and probes for the detection of *Gluconacetobacter* species in the pink sugarcane mealybug. *Microbial Ecol.* 50: 128–139.
- Fu, L., Chen, S, Yi, J., Hou, Z.** 2013. Effects of different fermentation methods on bacterial cellulose and acid production by *Gluconacetobacter xylinus* in Cantonese-style rice vinegar. *Food Sci. Technol. Int.* 20(5): 321-331.
- Fujii, T., Ingham, C., Nakayama, J., Beerthuyzen, M., Kunuki, R., Molenaar, D., Sturme, M., Vaughan, E., Kleerebezem, M., de Vos, W.** 2008. Two homologous *Agr*-like quorum-sensing systems cooperatively control adherence, cell morphology, and cell viability properties in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *J. Bacteriol.* 190(23): 7655-65.
- G-Alegría, E., López, I., Ruiz, J.I., Sáenz, J., Fernández, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., Ruiz-Larrea, F.** 2004. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiol. Lett.* 230(1): 53-61.

- Garijo, P., López, R., Santamaría, P., Ocón, E., Olarte, C., Sanz, S., Gutiérrez, A.R.** 2009. Presence of lactic bacteria in the air of a winery during the vinification period. *Int. J. Food Microbiol.* 136(1): 142-6.
- Gasson, M.J.** 1984. Transfer of sucrose fermenting ability, nisin resistance and nisin production in *Streptococcus lactis* 712. *FEMS Microbiol. Lett.* 21: 7-10.
- Gevers, D., Huyst, G., Swings, J.** 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for differentiation of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 31–36.
- Gill, A.O. & Holley, R.A.** 2003. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 degrees C. *Int. J. Food Microbiol.* 80(3): 251-9.
- Gilmore, M.S., Segarra, R.A., Booth, M.C., Bogie, C.P., Hall, L.R., Clewell, D.B.** 1994. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* 176(23): 7335-44.
- Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., García-Romero, E.** 2007. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *J. Agric. Food Chem.* 55(3): 608-13.
- Gómez-Manzo, S., Chavez-Pacheco, J.L., Contreras-Zentella, M., Sosa-Torres, M.E., Arreguín-Espinosa, R., Pérez de la Mora, M., Membrillo-Hernández, J., Escamilla, J.E.** 2010. Molecular and Catalytic Properties of the Aldehyde Dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a Quinoheme Protein Containing Pyrroloquinoline Quinone, Cytochrome b, and Cytochrome c. *J. Bacteriol.* 192: 5718-5724.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Rozés, N., Mas, A., Guillamón, J.M.** 2004. Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 96: 853-860.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M.** 2005. Application of molecular methods to demonstrate species and strain evolution of acetic acid bacteria population during wine production. *Int. J. Food Microbiol.* 102: 295-304.
- González, A., Guillamón, J.M., Mas, A., Poblet, M.** 2006a. Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 108: 141-146.
- González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M.** 2006b. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time and nested polymerase chain reactions. *FEMS Microbiol. Lett.* 254: 123-128.
- Gratia, A.** 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C. R. Soc. Biol. Fil.* 93: 1040-1041.
- Guerra, N.P., Macías, C.L., Agrasar, A.T., Castro, L.P.** 2005. Development of a bioactive packaging cellophane using Nisaplin as biopreservative agent. *Let. Appl. Microbiol.* 40(2): 106-10.
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., Giudici, P.** 2006. Characterization of acetic acid bacteria in "traditional balsamic Vinegar". *Int. J. Food Microbiol.* 106: 209-212.

- Gullo, M. & Giudici P.** 2008. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *Int. J. Food Microbiol.* 125: 46-53.
- Gullo, M., De Vero, L., Giudici, P.** 2009. Succession of selected strains of *Acetobacter pasteurianus* and other acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 2585-2589.
- Gullo, M., Verzelloni, E., Canonico, M.** 2014. Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects. *Process Bioch.* 49: 1571-1579.
- Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., Ishii, M., Igarashi, Y.** 2006. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 109: 79-89.
- Helander, I.M., Mattila-Sandholm, T.** 2000. Permeability barrier of the gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. *Int. J. Food Microbiol.* 60(2-3): 153-61.
- Hidalgo, C., Vegas, C., Mateo, E., Tesfaye, W., Cerezo, A.B., Callejón, R.M.** 2010. Effect of barrel design and the inoculation of *Acetobacter pasteurianus* in wine vinegar production. *Int. J. Food Microbiol.* 141: 56-62.
- Hidalgo, C., Mateo, E., Mas, A., Torija, M.J.** 2012. Identification of yeast and acetic acid bacteria isolated from the fermentation and acetification of persimmon (*Diospyros kaki*). *Food Microbiol.* 30 (1): 98-104.
- Hidalgo, C., Mateo, E., Mas, A., Torija, M.J.** 2013. Effect of inoculation on strawberry fermentation and acetification processes using native strains of yeast and acetic acid bacteria. *Food Microbiol.* 34: 88-94.
- Hidalgo, J.** 2003. Tratado de enología. Tomos I y II. Mundi-Prensa. Madrid.
- Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A., Miller, S.I.** 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature.* 436: 1171-1175.
- Holt, J.M., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.Y., Williams, S.T.** 1994. Genus *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.). (pp. 71-84) Maryland, U.S.A: Williams & Wilkens.
- Horn, N., Swindell, S., Dodd, H. y Gasson, M.J.** 1991. Nisin biosynthesis genes are encoded by a novel conjugative transposon. *Mol. Gen. Genet.* 228: 129-135.
- Ibarburu, I., Soria-Díaz, M.E., Rodríguez-Carvajal, M.A., Velasco, S.E., Tejero-Mateo, P., Gil-Serrano, A.M., Irastorza, A., Dueñas, M.T.** 2007. Growth and exopolysaccharide (EPS) production by *Oenococcus oeni* I4 and structural characterization of their EPSs. *J. Appl. Microbiol.* 103(2): 477-86.

- Ibarburu, I., Aznar R., Elizaquível, P., García-Quintáns, N., López, P., Munduate, A., Irastorza, A., Dueñas, M.T.** 2010. A real-time PCR assay for detection and quantification of 2-branched (1,3)-beta-D-glucan producing lactic acid bacteria in cider. *Int. J. Food Microbiol.* 143(1-2): 26-31.
- Ilabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., Romero, J., Mas, A.** 2008. Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 245-249.
- Ingram, L.** 1970. A ribosomal mechanism for synthesis of peptides related to nisin. *Biochim. Biophys. Acta.* 224: 263-265.
- Jara, C., Mateo, E, Guillamón, J.M., Mas, A., Torija, M.J.** 2013. Analysis of acetic acid bacteria by different culture-independent techniques in a controlled superficial acetification. *Ann. Microbiol.* 63: 393–398.
- Jin, Y., Zhang, T., Samaranyake, Y.H., Fang, H.H., Yip, H.K., Samaranyake, L.P.** 2005. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia.* 159(3): 353-60.
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., Ribereau-Gayon, P.** 1984. Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 153-156.
- Jung, G.** 1991. Lantibiotics: a survey. En: Nisin and novel lantibiotics. Jung, G. y Sahl, H.G. (eds.). pp. 1-34. ESCOM Science Publishers B.V. Leiden, The Netherlands.
- Kalchayanand, N., Hanlin, B., Ray, B.** 1992. Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.* 15: 239-243.
- Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C.P., Ray, B.** 1998. Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *J. Food Prot.* 61(4): 425-31.
- Kaletta, C. & Entian, K.D.** 1989. Nisin, a peptide antibiotic: cloning and sequencing of the *nisA* gene and posttranslational processing of its peptide product. *J. Bacteriol.* 171(3): 1597-601.
- Kaplan, J.B., Ragunath, C., Ramasubbu, N., Fine, D.H.** 2003. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous b-hexosaminidase activity. *J. Bacteriol.* 185(16): 4693-4698.
- Kaplan, J.B., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D.H., Ramasubbu, N.** 2004. Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob. Agents Ch.* 48(7): 2633-2636.
- Khan, A., Vu, K.D., Riedl, B., Lacroix, M.** 2015. Optimization of the antimicrobial activity of nisin, Na-EDTA and pH against gram-negative and gram-positive bacteria. *Food Sci. Technol.* 61: 124-129.
- Khusainov, R, van Heel, A.J., Lubelski, J., Moll, G.N., Kuipers, O.P.** 2015. Identification of essential amino acid residues in the nisin dehydratase NisB. *Front. Microbiol.* 6: 102.

- Kim, S.G. & Batt, C.A.** 1993. Cloning and sequencing of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* groESL operon. *Gene*. 127(1): 121-6.
- Klaenhammer, T.R.** 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12(1-3): 39-85.
- Kleerebezem, M., Quadri, L.E., Kuipers, O.P., de Vos, W.M.** 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 24: 895–904.
- Knoll, C., Divol, B., du Toit, M.** 2008. Influence of Phenolic Compounds on Activity of Nisin and Pediocin PA-1. *Am. J. Enol. Vitic.* 59: 4.
- Kozak, W., Rajchert-trzpił, M., Dobrzanski, W.T.** 1974. The effect of proflavin, ethidium bromide and an elevated temperature on the appearance of nisin-negative clones in nisin-producing strains of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.* 83: 295-302.
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., Uchiyama, H.** 2008. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *J. Biosci. Bioeng.* 106(4): 381-6.
- Kubota, H., Senda, S., Tokuda, H., Uchiyama, H., Nomura, N.** 2009. Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149. *Food Microbiol.* 26(6): 592-597.
- Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., Siezen, R.J., De Vos, W.M.** 1993. Characterization of the nisin gene cluster nisABTCIPR of *Lactococcus lactis*. Requirement of expression of the *nisA* and *nisl* genes for development of immunity. *Eur. J. Biochem.* 216(1): 281-91.
- Kuipers, O.P., Beerthuyzen, M.M., de Ruyter, P.G., Luesink, E.J., de Vos, W.M.** 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.* 270: 27299– 27304.
- Kumar, C.G. & Anand, S.K.** 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 42(1-2): 9-27.
- Kýla-Nikkilä, K., Ra, R. y Saris, P.E.J.** 1999. Induction by nisin seems to occur via the membrane and not only directly from the hydrophilic exterior. Abstracts of the Sixth Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, C86, Veldhoven, Holanda.
- Ladero, V., Rattray, F.P., Mayo, B., Martín, M.C., Fernández, M., Alvarez, M.A.** 2011. Sequencing and transcriptional analysis of the biosynthesis gene cluster of putrescine-producing *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(18): 6409-18.
- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E., Ribéreau-Gayon, P.** 1983. Occurrence of lactic Acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 46(4): 874-80.
- Landete, J.M., Ferrer, S., Pardo, I.** 2005. Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine?. *J. Appl. Microbiol.* 99: 580-6.
- Landete, J.M., Pardo, I., Ferrer, S.** 2007. Tyramine and phenylethylamine production among lactic acid bacteria isolated from wine. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 364-8.

- Larsen, R., Buist, G., Kuipers, O.P. Kok, J.** 2004. ArgR and AhrC are both required for regulation of arginine metabolism in *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. 186(4): 1147-57.
- Laverty, G., Gorman, S.P., Gilmore, B.F.** 2014. Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. Pathogens. 3(3): 596-632.
- Leathers, T.D. & Bischoff, K.M.** 2011. Biofilm formation by strains of *Leuconostoc citreum* and *L. mesenteroides*. Biotechnol. Lett. 33(3): 517-23.
- Li, H. & O'Sullivan, D.J.** 2002. Heterologous expression of the *Lactococcus lactis* bacteriocin, nisin, in a dairy *Enterococcus* strain. Appl. Environ. Microbiol. 68(7): 3392-400.
- Linares, D.M., del Río, B., Ladero, V., Redruello, B., Martín, M.C., Fernández, M., Alvarez, M.A.** 2013. The putrescine biosynthesis pathway in *Lactococcus lactis* is transcriptionally regulated by carbon catabolic repression, mediated by CcpA. Int. J. Food Microbiol. 165(1): 43-50.
- Lisdiyanti, P., Katsura, K., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., Komagata, K.** 2001. Identification of *Acetobacter* strains isolated from Indonesian sources, and proposals of *Acetobacter syzygii* sp. nov., *Acetobacter cibinongensis* sp. nov., and *Acetobacter orientalis* sp. nov. J. Gen. Appl. Microbiol. 47: 119-131.
- Llaguno-Marchena, C. & Polo, M.C.** 1991. El Vinagre de Vino. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.
- Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A., Ledoux, O.** 1991. Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes. J. Appl. Bacteriol. 71: 501-508.
- Lonvaud-Funel A.** 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. Anton. Leeuw. 76(1-4): 317-31.
- Lonvaud-Funel, A.** 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 199(1): 9-13.
- Lonvaud-Funel, A.** 2006. Bacterias lácticas y fermentación maloláctica. En: Informe Técnico III. Encuentro Enológico; "Fermentación Maloláctica". (Ed). Fundación para la Cultura del vino. Madrid, 15 marzo 2006. Pp 22-29.
- López, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L. Orr, E., Phister, T., Marshall, M.** 2003. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 69: 6801-6807.
- López, I., Tenorio, C., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., Ruiz-Larrea, F.** 2007. Evidence of mixed wild populations of *Oenococcus oeni* strains during wine spontaneous malolactic fermentations. Eur. Food Res. Technol. 226: 215-223.
- López, I., Torres, C., Ruiz-Larrea, F.** 2008. Genetic typification by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* wine strains. Eur. Food Res. Technol. 227: 547-555.
- Mahdavi, M., Jalali, M., Kermanshahi, R.K.** 2007. The effect of nisin on biofilm-forming and pathogenic bacteria using micro titer plate method. Res. Pharma. Sci. 2(2): 113-118.

- Maitre, M., Weidmann, S., Dubois-Brissonnet, F., David, V., Covès, J., Guzzo, J.** 2014. Adaptation of the wine bacterium *Oenococcus oeni* to ethanol stress: role of the small heat shock protein Lo18 in membrane integrity. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(10): 2973-80.
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J.M.** 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.* 143(6): 754-8.
- Martínez, B. Suárez, J.E., Rodríguez, A.** 1995. Antimicrobials Produced by Wild *Lactococcal* Strains Isolated from Homemade Cheeses. *J. Food Protect.* 10: 1059-1064.
- Mas, A. Torija, M.J., García-Parrilla, M.C., Troncoso A.M.** 2014. Acetic Acid Bacteria and the Production and Quality of Wine Vinegar. *The Scientific World Journal.* Vol. 2014, Article ID 394671, 6 pages.
- Mataraci, E. & Dosler, S.** 2012. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(12): 6366-71.
- Mateo, E., Torija, M.J., Mas, A., Bartowsky, E.J.** 2014. Acetic acid bacteria isolated from grapes of South Australian vineyards. *Int. J. Food Microbiol.* 178: 98–106
- McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C.** 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* 25(3): 285-308.
- Mendes Faia, A. & Radler, F.** 1990. Investigation of the bactericidal effect of Nisin on lactic acid bacteria of wine. *Vitis* 29: 233-238.
- Mesa, M.M., Macías, M., Cantero, D., Barja, F.** 2003. Use of the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of viable and total acetic acid bacteria from vinegar fermentation. *J. Fluoresc.* 13: 261-265.
- Mierau, I. & Kleerebezem, M.** 2005. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 705–717.
- Millet, V. & Lonvaud-Funel, A.** 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 136-141.
- Miyoshi, A., Rochat, T., Gratadoux, J.J., Le Loir, Y., Oliveira, S.C., Langella, P., Azevedo, V.** 2003. Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. *Gene. Mol. Res.* 2(4): 348-59.
- Moll, G.N., Konings, W.N., Driessen, A.J.** 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Anton. Leeuw.* 76(1-4): 185-98.
- Montersino, S., Prieto, A., Muñoz, R., de Las Rivas, B.** 2008. Evaluation of exopolysaccharide production by *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from wine. *J. Food Sci.* 73(4): M196-9.
- Montville, T.J. & Chen, Y.** 1998. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50(5): 511-9.
- Mørtvedt, Cl., Nissen-Meyer, J., Sletten, K., Nes, I.F.** 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(6): 1829-34.

- Mulders, J.W., Boerrigter, I.J., Rollema, H.S., Siezen, R.J., de Vos, W.M.** 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *Eur. J. Biochem.* 201(3): 581-4.
- Muller, P., Guggenheim, B., Schmidlin, P. R.** 2007. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *Eur. J Oral. Sci.* 115: 77-80.
- Muscariello, L., Marino, C., Capri, U., Vastano, V., Marasco, R., Sacco, M.** 2013. CcpA and three newly identified proteins are involved in biofilm development in *Lactobacillus plantarum*. *J. Basic Microbiol.* 53(1): 62-71.
- Nanda, K., Taniguchi, M., Ujike, S., Ishihara, N., Mori, H., Ono, H., Murooka, Y.** 2001. Characterization of acetic acid bacteria in traditional acetic acid fermentation of rice vinegar (komesu) and unpolished rice vinegar (kurosus) produced in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 986-990.
- Navaratna, M.A., Sahl, H.G., Tagg, J.R.** 1998. Two-component anti-*Staphylococcus aureus* lantibiotic activity produced by *Staphylococcus aureus* C55. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12): 4803-8.
- Nazar J.** 2007. Biofilms bacterianos. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello.* 67: 61-72.
- Nel, H.A., Bauer, R., Wolfaardt, G.M., Dicks, L.M.T.** 2002. Effect of Bacteriocins Pediocin PD-1, Plantaricin 423, and Nisin on Biofilms of *Oenococcus oeni* on a Stainless Steel Surface. *Am. J. Enol. Vitic.* 53: 191-196.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., Holo, H.** 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Anton. Leeuw.* 70(2-4): 113-28.
- Nilsson, R.E., Ross, T., Bowman, J.P.** 2011. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 150(1): 14-24.
- O'Toole, G. & Kolter, R.** 1998a. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28(3): 449-61.
- O'Toole, G., & Kolter, R.** 1998b. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30(2): 295-304.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R.** 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 49-79.
- O'Toole, G. & Stewart, P.S.** 2005. Biofilms strike back. *Nat. Biotechnol.* 23(11): 1378-9.
- Ogino, H., Azuma, Y., Hosoyama, A., Nakazawa, H., Matsutani, M., Hasegawa, A., Otsuyama, K., Matsushita, K., Fujita, N., Shirai, M.** 2011. Complete genome sequence of NBRC 3288, a unique cellulose-nonproducing strain of *Gluconacetobacter xylinus* isolated from vinegar. *J. Bacteriol.* 193(24): 6997-8.

- Okuda, K., Zendo, T., Sugimoto, S., Iwase, T., Tajima, A., Yamada, S., Sonomoto, K., Mizunoe, Y.** 2013. Effects of bacteriocins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(11): 5572-9.
- Olasupo, N.A., Schillinger, U., Narbad, A., Dodd, H., Holzapfel, W.H.** 1999. Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from wara, a traditional Nigerian cheese product. *Int. J. Food Microbiol.* 53(2-3): 141-52.
- Olguín, N., Bordons, A., Reguant, C.** 2009. Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol.* 26(2): 197-203.
- Orgaz, B., Lobete, M.M., Puga, C.H., San Jose, C.** 2011. Effectiveness of chitosan against mature biofilms formed by food related bacteria. *Int. J. Mol. Sci.* 12(1): 817-28.
- Panoff, J.M., Legrand, S., Thammavongs, B., Boutibonnes, P.** 1994. The cold shock response in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr. Microbiol.* 29: 213-216.
- Pantarella, F., Valenti, P., Natalizi, T., Passeri, D., Berlutti, F.** 2013. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann. Ig.* 25(1): 31-42.
- Peeters, E., Nelis, H.J., Coenye, T.** 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Methods.* 72(2): 157-65.
- Pérez, R.H., Zendo, T., Sonomoto, K.** 2014. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories* 13(1): S3.
- Pérez-Martín, F., Seseña, S., Fernández-González, M., Arévalo, M., Palop, M.L.** 2014. Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. *Int. J. Food Microbiol.* 190: 44-53.
- Piard, J.C., Muriana, P.M., Desmazeaud, M.J., Klaenhammer, T.R.** 1992. Purification and Partial Characterization of Lacticin 481, a Lanthionine-Containing Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(1):279-84.
- Pimentel-Filho, N. de J., Martins, M.C., Nogueira, G.B., Mantovani, H.C., Vanetti, M.C.** 2014. Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. *Int. J. Food Microbiol.* 190: 1-8.
- Poblet, M., Rozés, N., Guillamón, J.M., Mas, A.** 2000. Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *Lett. Appl. Microbiol.* 31: 63-67.
- Poolman, B., Driessen, A.J.M., Konings, W.N.** 1987a. Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 169: 5597-5604.
- Poolman, B., Smid, E.J., Konings, W.N.** 1987b. Kinetic properties of a phosphate-bond-driven glutamate-glutamine transport system in *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *J. Bacteriol.* 169: 2755-2761.

- Price, C.E., Zeyniyev, A., Kuipers, O.P., Kok, J.** 2012. From meadows to milk to mucosa adaptation of *Streptococcus* and *Lactococcus* species to their nutritional environments. *FEMS Microbiol. Rev.* 36: 949-971.
- Prieto, C., Jara, C., Mas, A., Romero, J.** 2007. Application of molecular methods for analyzing the distribution and diversity of acetic acid bacteria in Chilean vineyards. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 348-355.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J., Ziebuhr, W.** 2000. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(12): 3357-63.
- Radler, F.** 1990. Possible Use of Nisin in Winemaking. II. Experiments to Control Lactic Acid Bacteria in the Production of Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 41: 7-11.
- Ramírez-Mata, A., Fernández-Domínguez, I.J., Nuñez-Reza, K.J., Xiqui-Vázquez, M.L., Baca, B.E.** 2014. Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: quorum sensing, di-GMPc y óxido nítrico. *Rev. Argent. Microbiol.* 46(3): 242-255.
- Raspor, P. & Goranović, D.** 2008. Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria. *Cr. Rev. Biotechnol.* 28: 101-124.
- Rauch, P.J.G., Beerthuyzen, M.M., de Vos, W.M.** 1994. Distribution and evolution of nisin-sucrose elements in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1798-1804.
- Redelman, C.V., Maduakolam, C., Anderson, G.G.** 2012. Alcohol treatment enhances *Staphylococcus aureus* biofilm development. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 66(3):411-8.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A.** 2000. Handbook of enology. The Microbiology of Wine and Vinifications, Vol. I. Wiley, West Sussex, England.
- Rochat, T., Boudebouze, S., Gratadoux, J.J., Blugeon, S., Gaudu, P., Langella, P., Maguin, E.** 2012. Proteomic analysis of spontaneous mutants of *Lactococcus lactis*: involvement of GAPDH and arginine deiminase pathway in H₂O₂ resistance. *Proteomics.* 12: 1792-1805.
- Rodríguez, J.M., Cintas, L.M., Casaus, P., Horn, N., Dodd, H.M., Hernández, P.E., Gasson, M.J.** 1995. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* 78(2): 109-15.
- Rogers, L.A., Whittier, E.O.** 1928. Limiting Factors in the Lactic Fermentation. *J. Bacteriol.* 16(4): 211-29.
- Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Torres, C., Ruiz-Larrea, F.** 2007. Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 116(1): 32-6.
- Rollema, H.S., Kuipers, O.P., Both, P., de Vos, W.M., Siezen, R.J.** 1995. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(8): 2873-8.
- Rollema, H.S., Metzger, J.W., Both, P., Kuipers, O.P., Siezen, R.J.** 1996. Structure and biological activity of chemically modified nisin A species. *Eur. J. Biochem.* 241(3): 716-22.

- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., Guillamón, J.M.** 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1981-1987.
- Ruiz-Larrea, F., Rojo-Bezares, R., Sáenz, Y., Navarro, L., Díez, L., Portugal, C.B., Zarazaga, M. Torres, C.** 2007. Bacteriocins for wine microbiological control and reduction of SO₂ levels. Vol. 80, Número 9: 445-457.
- Ryan, M.P., Flynn, J., Hill, C., Ross, R.P., Meaney, W.J.** 1999. The natural food grade inhibitor, lactacin 3147, reduced the incidence of mastitis after experimental challenge with *Streptococcus dysgalactiae* in nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82(12): 2625-31.
- Sahl, H.G., Jack, R.W., Bierbaum, G.** 1995. Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.* 230(3): 827-53.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** 1989. In: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, vol. 1. CSH Press, pp. 1.26-1.28.
- Sanders, J.M., Venema, G., Kok, J., Leenhouts, K.** 1998. Identification of a sodium chloride-regulated promoter in *Lactococcus lactis* by single-copy chromosomal fusion with a reporter gene. *Mol. Gen. Genet.* 257: 681-5.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Bacteriol.* 184(4): 1140-1154.
- Sauer, S. & Kliem, M.** 2010. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8: 74-82.
- Schillinger, U. & Holzapfel, W.H.** 1996. Guidelines for manuscripts on bacteriocins of lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 33(2-3): iii-v.
- Schnell, N., Entian, K.D., Götz, F., Hörner, T., Kellner, R., Jung, G.** 1989. Structural gene isolation and prepeptide sequence of gallidermin, a new lanthionine containing antibiotic. *FEMS Microbiol. Lett.* 49(2-3): 263-7.
- Schüller, G., Hertel, C., Hammes, W.P.** 2000. *Gluconacetobacter entanii* sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 2013-2020.
- Shemesh, M., Kolter, R., Losick, R.** 2010. The biocide chlorine dioxide stimulates biofilm formation in *Bacillus subtilis* by activation of the histidine kinase KinC. *J. Bacteriol.* 192(24): 6352-6.
- Siegers, K. & Entian, K.D.** 1995. Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1082-1089.
- Sievers, M., Sellmer, S., Teuber, M.** 1992. *Acetobacter europaeus* sp. nov., a main component of industrial Vinegar fermenters in Central Europe. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 386-392.
- Sievers, M., Teuber, M.** 1995. The microbiology and taxonomy of *Acetobacter europaeus* in commercial vinegar production. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 84-95.

- Sievers, M., Lorenzo, A., Gianotti, S., Boesch, C., Teuber, M.** 1996. 16-23S ribosomal RNA spacer regions of *Acetobacter europaeus* and *A. xylinum*, tRNA genes and antitermination sequences. FEMS Microbiol. Lett. 142: 43-48.
- Sievers, M. & Swings, J.** 2005. Family *Acetobacteraceae*. In: Garrity, G.M. (Ed.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second ed., vol. 2. Springer, New York, pp. 41-95 (Part C).
- Silhavy, K. & Mandl, K.** 2006. *Acetobacter tropicalis* in spontaneously fermented wines with vinegar fermentation in Austria. Mitteilungen Klosterneuburg 56: 102-107.
- Silva, L.R., Cleenwerck, I., Rivas, R., Swings, J., Trujillo, M.E., Willems, A., Velázquez, E.** 2006. *Acetobacter oeni* sp. nov., isolated from spoiled red wine. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 21-4.
- Sinde, E. & Carballo, J.** 2000. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. Food Microbiol. 17: 439-447.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J.** 1962. The comparison of dendrograms by objective methods. Taxon 11, 33-40.
- Sokollek, S.J., Hertel, C., Hammes, W.P.** 1998. Description of *Acetobacter obodiens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 935-940.
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A., Klaenhammer, T.R.** 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 57(12): 3613-5.
- Stewart, P.S., & Costerton, J.W.** 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, Lancet 358: 135-138.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W.** 2002a. Biofilms as complex differentiated communities. Annu. Rev. Microbiol. 56: 187-209.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C.J., Wilson, S., Klapper, I.** 2002b. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 29(6): 361-367.
- Suárez, J.A. & Iñigo, B.** 2004. Microbiología Enológica. Fundamentos de vinificación. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp.547.
- Sudagidan, M. & Yemenicioğlu, A.** 2012. Effects of nisin and lysozyme on growth inhibition and biofilm formation capacity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk and cheese samples. J. Food Prot. 75(9): 1627-33.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W.** 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40(3): 722-56.
- Tang, X., Flint, S.H., Bennett, R.J., Brooks, J.D., Morton, R.H.** 2009. Biofilm growth of individual and dual strains of *Klebsiella oxytoca* from the dairy industry on ultrafiltration membranes. J. Ind. Microbiol Biotechnol. 36(12): 1491-1497.

- Tawakoli, P.N., Al-Ahmad, A., Hoth-Hannig, W., Hannig, M., Hannig, C.** 2013. Comparison of different live/dead staining for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clin. Oral Investig.* 17(3): 841-50.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233-2239.
- Terrade, N. & Mira de Orduña, R.** 2006. Impact of winemaking practices on arginine and citrulline metabolism during and after malolactic fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 101(2): 406-11.
- Terrade, N. & Mira de Orduña, R.** 2009. Arginine and citrulline do not stimulate growth of two *Oenococcus oeni* strains in wine. *FEMS Microbiol. Lett.* 290: 98-104.
- Tesfaye, W., Morales, M.L., García-Parrilla, M.C., Troncoso, M.** 2002. Wine Vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends Food Sci. Tech.* 13: 12-21.
- Tong, Z., Dong, L., Zhou, L., Tao, R., Ni, L.** 2010. Nisin inhibits dental caries-associated microorganism in vitro. *Peptides.* 31(11): 2003-8.
- Tong, Z., Zhang, L., Ling, J., Jian, Y., Huang, L., Deng, D.** 2014. An in vitro study on the effect of free amino acids alone or in combination with nisin on biofilms as well as on planktonic bacteria of *Streptococcus mutans*. *PLoS One.* 17;9(6):e99513.
- Torija, M.J., Mateo, E., Guillamón, J.M., Mas, A.** 2010. Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan-MGB probes. *Food Microbiol.* 27: 257-265.
- Trcek, J., Ramus, J., Raspor, P.** 1997. Phenotypic characterization and RAPD-PCR profiling of *Acetobacter* sp. isolated from spirit vinegar production. *Food Technol. Biotech.* 35: 63-67.
- Trcek, J., Raspor, P., Teuber, M.** 2000. Molecular identification of *Acetobacter* isolates from submerged vinegar production, sequence analysis of plasmid pJK2-1 and application in the development of a cloning vector. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 289-95.
- Trcek, J. & Teuber, M.** 2002. Genetic restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions of the acetic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 208: 69-75.
- Trcek, J.** 2005. Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 735-745.
- Trcek, J., Jernejc, K., Matsushita, K.** 2007. The highly tolerant acetic acid bacterium *Gluconacetobacter europaeus* adapts to the presence of acetic acid by changes in lipid composition, morphological properties and PQQ-dependent ADH expression. *Extremophiles* 11: 627-635.
- Valera, M.J., Laich, F., González, S.S., Torija, M.J., Mateo, E., Mas, A.** 2011. Diversity of acetic acid bacteria present in healthy grapes from the Canary Islands. *Int. J. Food Microbiol.* 151: 105-112.

- Valera, M.J., Torija, M.J., Mas, A., Mateo, E.** 2015. Acetic acid bacteria from biofilm of strawberry vinegar visualized by microscopy and detected by complementing culture-dependent and culture-independent techniques. *Food Microbiol.* 46: 452-62.
- Van Bokhorst-van de Veen, H., Abee, T., Tempelaars, M., Bron, P.A., Kleerebezem, M., Marco, M.L.** 2011. Short- and Long-Term Adaptation to Ethanol Stress and Its Cross-Protective Consequences in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(15): 5247-5256.
- Vegas, C., Mateo, E., González, A., Jara, C., Guillamón, J.M., Poblet, M., Torija, M.J., Mas, A.** 2010. Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production. *Int. J. Food Microbiol.* 138: 130–136.
- Vegas, C., González, A., Mateo, E., Mas, A., Poblet, M., Torija, M.J.** 2013. Evaluation of representativity of the acetic acid bacteria species identified by culture-dependent method during a traditional wine vinegar production. *Food Res. Int.* 51: 404-411.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823-6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J., Lupski, J.R.** 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Method Mol. Cell. Biol.* 5: 25–40.
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beaugerard, P., Losick, R., Kolter, R.** 2013. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat. Rev. Microbiol.* 1(3): 157-68.
- Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A., Yang, Z.** 2015. Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *Int. J. Biol. Macromol.* 74: 119-26.
- Weber, F.J., & deBont. J.A.** 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1286:225–245.
- Wegmann, U., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Buist, G., Shearman, C., Canchaya, C., Ventura, M., Goesmann, A., Gasson, M.J., Kuipers, O.P., van Sinderen, D., Kok, J.** 2007. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J. Bacteriol.* 189(8): 3256-70.
- Wiedemann, I., Breukink E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B., Sahl, H.G.** 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *J. Biol. Chem.* 276(3): 1772–1779.
- Wiedemann, I., Benz, R., Sahl, H.G.** 2004. Lipid II-mediated pore formation by the peptide antibiotic nisin: a black lipid membrane study. *J. Bacteriol.* 186(10): 3259-61.
- Winkelströter, L.K., Teixeira, F.B., Silva, E.P., Alves, V.F., De Martinis, E.C.** 2014. Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. *Microb. Ecol.* 68(1): 35-46.
- Wirawan, R.E., Klesse, N.A., Jack, R.W., Tagg, J.R.** 2006. Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(2): 1148-56.

- Yakushi, T., Matsushita, K.** 2010. Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86(5): 1257-65.
- Yamada, Y. & Yukphan, P.** 2008. Genera and species in acetic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 125: 15-24.
- Yamada, Y., Yukphan, P., Vu, H.T.L., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y.** 2012. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58: 397-404.
- Zendo, T., Fukao, M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J., Sonomoto, K.** 2003. Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67(7): 1616-9.
- Zendo T.** 2013. Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77(5): 893-9.
- Zhang, J., Fu, R.Y., Hugenholtz, J., Li, Y., Chen, J.** 2007. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against acid stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(16): 5268-75.
- Zhang, Y., Zhang, Y., Zhu, Y., Mao, S., Li, Y.** 2010. Proteomic analyses to reveal the protective role of glutathione in resistance of *Lactococcus lactis* to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(10): 3177-86.

Direcciones web consultadas

<http://www.attrtron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>

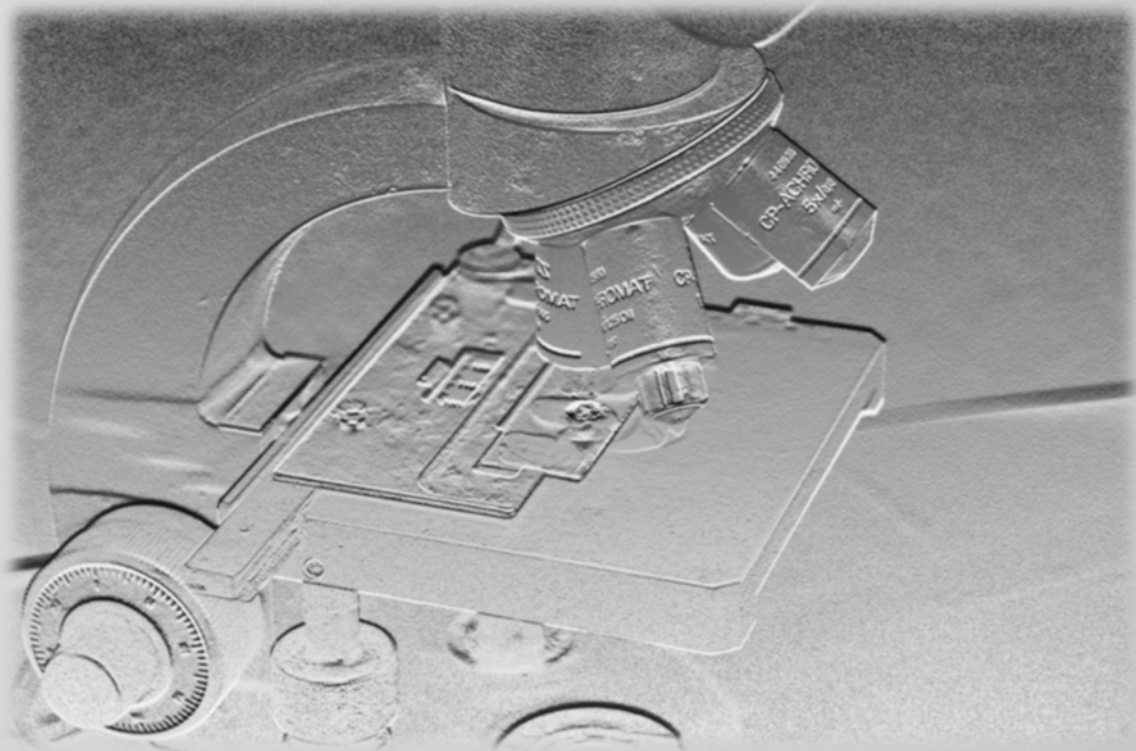
<http://www.ebi.ac.uk/services>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=433>

<http://insilico.ehu.es/digest/>

http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?llm00330



Anexos

Annexes

Artículo 1 / Article 1

Artículo 2 / Article 2

Artículo 3 / Article 3

ANEXOS / ANNEXES

1- Strain typing of acetic acid bacteria responsible for vinegar production by the submerged elaboration method.

Rocío Fernández-Pérez, Carmen Torres, Susana Sanz, Fernanda Ruiz-Larrea.

Food Microbiology (2010) 27: 973-978.

2- Rapid molecular methods for enumeration and taxonomical identification of acetic acid bacteria responsible for submerged vinegar production.

Rocío Fernández-Pérez, Carmen Torres, Susana Sanz, Fernanda Ruiz-Larrea.

European Food Research and Technology (2010) 231:813–819.

3- Transcriptome analysis shows activation of the arginine deiminase pathway in *Lactococcus lactis* as a direct response to ethanol stress.

Lorena Díez, Ana Solopova, Rocío Fernández-Pérez, Miriam González, Carmen Tenorio, Oscar P. Kuipers, Fernanda Ruiz-Larrea.

Applied and Environmental Microbiology, en revisión

