



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Grado en Enología

**Estudio y optimización de medios de cultivo para el
crecimiento de *Oenococcus oeni***

Alumno: Irene Álvarez Muñoz

Tutor/es: Josefina Vila Crespo

Violeta Ruipérez Prádanos

Junio 2017

ÍNDICE

Abstract	3
1.- Resumen	3
2.- Introducción	4
2.1. Crecimiento de <i>O. oeni</i>	5
2.2. Revisión de medios de cultivo descritos en la bibliografía	6
3.- Justificación	9
4.- Objetivos	9
5.- Materiales y métodos	10
5.1. Microorganismos	10
5.2. Medios de cultivo	10
5.2.1. Mantenimiento de los microorganismos	10
5.2.2. Medios de cultivo estudiados	11
5.2.2.1. MRS	11
5.2.2.2. MLO	11
5.2.2.3. MLO modificado	12
5.3. Ensayos de crecimiento bacteriano	12
5.3.1. Medio sólido	13
5.3.2. Medio líquido: curva de crecimiento	13
5.4. Identificación de microorganismos	13
5.4.1. Tinción Gram	13
5.4.2. Prueba de la catalasa	14
6.- Resultados y discusión	14
6.1. Elección de los medios de cultivo	14
6.2. Ensayos de crecimiento bacteriano	15
6.2.1. MRS	15
6.2.2. MLO	17
6.2.3. MLO modificado	19
6.3. Identificación de microorganismos	24
7.- Conclusiones	26
8.- Bibliografía	27

Abstract

The purpose of this study is to find and optimize a culture media which would enhance growth of *Oenococcus oeni*.

Oenococcus oeni is a lactic bacteria responsible for performing malolactic fermentation (MLF) in wine.

In order to accomplish that, a review of a number of mediums for this bacteria published across literature was completed. Upon comparison of the media compositions, *Oenococcus oeni* growth rate results, and specificity parameters, two culture media, MRS and MLO, were selected for further investigation at laboratory scale. Laboratory tests demonstrated that MLO medium was most suitable for the growth of *Oenococcus oeni*. Several improvements on the media were proposed to optimize the bacteria manufacture and reduce associated costs.

1.- Resumen

El trabajo desarrollado aborda el tema de las bacterias lácticas que llevan a cabo el proceso de fermentación maloláctica en vino. El presente estudio se ha centrado en la búsqueda y optimización de medios de cultivo para el crecimiento en laboratorio de *Oenococcus oeni*.

En primer lugar, se ha realizado una revisión bibliográfica de los diferentes medios descritos para dicha bacteria, comparando su composición y los resultados obtenidos en el crecimiento de *O. oeni*. Posteriormente, se seleccionaron dos medios de cultivo, MRS y MLO, en función de los parámetros de especificidad y velocidad de crecimiento, para trabajar con ellos en laboratorio. El medio MLO resultó adecuado para el crecimiento de *O. oeni*, por lo que se propusieron diferentes modificaciones para optimizar su elaboración y coste en el laboratorio.

2.- Introducción

La fermentación maloláctica (FML) es un proceso complejo durante la vinificación llevado a cabo por las bacterias lácticas (BAL). Tradicionalmente, tiene lugar una vez acabada la fermentación alcohólica (FA) y consiste en la transformación del ácido málico presente en el vino en ácido láctico, produciendo una desacidificación biológica. Consecuentemente, se produce un aumento del pH de entre aproximadamente 0,1 a 0,5 unidades y cambia el perfil organoléptico del vino (Bordons *et al.*, SEBBM). Esto hace que mejore la sensación en boca, desaparezcan los aromas primarios, vegetales y afrutados y aumenten los lácteos, más suaves. Por otro lado, debido a que las BAL agotan el ácido málico y la concentración de nutrientes, impiden el crecimiento de otras bacterias o microorganismos negativos para el vino, por lo que provoca la estabilidad biológica del mismo (Swiegers *et al.*, 2005; García-Ruiz *et al.*, 2012).

La FML se puede ver afectada por distintos factores (pH, concentración de etanol, SO₂, temperatura, compuestos fenólicos o ácidos grasos) y es un proceso que modifica positivamente la calidad del vino, si se realiza correctamente. Este proceso se puede realizar de forma espontánea (con bacterias indígenas presentes en el vino) o inoculando cultivos iniciadores de la FML. La FML que arranca de forma espontánea puede durar varias semanas o incluso meses y es difícil de controlar, sin embargo con la ayuda de iniciadores esta fermentación inducida se realiza de forma más rápida, reduce el posible deterioro por acción de otras BAL y permite el control de la cepa inoculada (Berbegal *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2006).

Cuando la FML se desarrolla de forma espontánea, puede dar consecuencias negativas que empeoren la calidad organoléptica del vino, tales como una subida de la acidez volátil, caída del color, una alta producción de acetoína y diacetilo, desaparición de aromas varietales de la uva y formación de alteraciones aromáticas, o la producción de aminas biógenas (García Romero *et al.*, 2003). Para evitar esto, se está utilizando la inoculación de bacterias lácticas seleccionadas, principalmente la especie *Oenococcus oeni*.

Las BAL son bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas. Forman un grupo muy extenso que incluye los géneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* (Zúñiga *et al.*, 1983). Actualmente, el género *Oenococcus*, y dentro de éste, la especie *Oenococcus oeni* (anteriormente nombrado como *Leuconostoc oenos*) (Marques *et al.*, 2011) es la bacteria más utilizada por las bodegas para llevar a cabo la FML de forma inducida, ya que asegura una completa y rápida fermentación y es la que mejor soporta las condiciones de un vino (Berbegal *et al.*, 2015; Gutiérrez, 2015).

O. oeni es una bacteria heterofermentativa, ya que no sólo produce ácido láctico, sino también CO₂, ácido acético y/o etanol mediante la vía de las pentosas fosfato (Zúñiga *et al.*, 1983). En relación a sus características morfológicas, no tiene motilidad y no forma esporas, presenta forma de coco y puede formar parejas o cadenas, con un diámetro alrededor de 0,5-0,7 µm y una longitud de 0,7-1,2 µm. Es catalasa negativa, ya que tiene carencia de la enzima citocromo catalasa (Parra, 2010).

A pesar de que se ha comprobado que otras especies, como *Lactobacillus plantarum*, también realizan la FML, *O. oeni* es la especie predominante en este proceso y que presenta más ventajas para la misma. Se encuentra presente en la uva y al final de la fermentación alcohólica sigue estando en el vino. Tras sufrir una competencia con las levaduras durante la FA, es la que se encuentra en mayor proporción ya que soporta mejor que las demás especies las condiciones de estrés presentes en el vino (Landete *et*

al., 2005), tolerando unos niveles de pH bajos y una alta concentración de SO₂ y grado alcohólico (Liu, 2002). Estudios realizados sobre el papel que juegan las bacterias lácticas en la calidad o depreciación de un vino, indican que *O. oeni* es la especie que ha demostrado atribuir menos defectos sensoriales al vino (Lonvaud-Funel, 1999).

La selección de cepas de *O. oeni* óptimas para el desarrollo de la FML en las condiciones deseadas requiere un medio de cultivo general en laboratorio que pueda proporcionar un buen crecimiento bacteriano. En la bibliografía se encuentran diversos medios para el cultivo de esta bacteria (Berbegal, C., 2014; Caspritz & Radler, 1983; Claus *et al.*, 1983; De Man, Rogosa & Sharpe, 1960; Dicks & van Vuuren, 1990; Gutiérrez Hernández, G.D., 2015; McDonald *et al.*, 1987; Terrade *et al.*, 2009; Zúñiga, M., Pardo, I., & Ferrer, S., 1993), por lo que se requiere una revisión de estos medios para la elección del medio de cultivo que presente unas condiciones más favorables para el crecimiento de distintas cepas de *O. oeni*.

2.1. Crecimiento de *O. oeni*

El mosto y el vino son el hábitat principal de *O. oeni*, por ello puede crecer a concentraciones altas de etanol (10%) y tolerar niveles de pH propios del vino estando alrededor de 3,5 y 3,8. Es acidofílica, aunque es favorable un pH de 4,8 para su crecimiento inicial. Con respecto a la temperatura, la óptima en medios de laboratorio es de 27°C, por ello cuando se inocula en vino pierde algo de viabilidad ya que la temperatura se encuentra a 15-25°C y para la mayoría de cepas de *O. oeni* tiene un óptimo de 20-22°C en este ambiente (Kelly *et al.*, 1989).

El desarrollo de medios de cultivo en laboratorio para esta bacteria es muy importante, ya que es la bacteria láctica mejor adaptada a las características enológicas presentes en el vino. Se deben hacer diferentes ensayos para obtener un crecimiento óptimo y con un rendimiento adecuado para la selección y producción de cultivos iniciadores de la FML.

O. oeni es una bacteria que tiene algunas necesidades nutricionales, tales como un medio rico en aminoácidos y factores de crecimiento complejos. Aunque se han obtenido medios de cultivo definidos para *O. oeni*, al conseguir poblaciones bacterianas no muy altas, no permiten el estudio del microorganismo. Por otro lado, los medios que tienen crecimiento alto, no poseen características enológicas. (Gutiérrez, 2015). Algunos estudios (Dicks *et al.*, 1995) describen la necesidad de un medio de cultivo suplementado con zumo de tomate o de uva, ácido pantoténico o incluso un derivado de glucosa de pantotenato para su crecimiento en laboratorio. Si no se dan estas condiciones en un medio de cultivo, el rendimiento del mismo va a ser escaso. Por lo tanto, los medios descritos para esta bacteria suelen estar suplementados con zumo de tomate, ya que funciona como fuente de ácido pantoténico siendo éste un buen factor de crecimiento para las bacterias presentes en el vino (Terrade *et al.*, 2009). Otros componentes muy comunes en estos medios para mejorar la cantidad de producción de biomasa suelen ser peptona, extracto de levadura y Tween 80, (Guerrini *et al.*, 2002) así como el agar que hace posible que un medio resulte sólido o líquido. Otros estudios indican que el crecimiento de *O. oeni* es mejor en medios con mezcla de azúcares (glucosa-fructosa) que en medios con azúcares simples (Maicas *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005). Por otro lado, el uso de componentes como el manganeso o manoproteínas de levadura, demuestra que las auxotrofías añadidas a un medio de cultivo para favorecer el crecimiento bacteriano, son específicas para cada cepa (Terrade *et al.*, 2009; Berbegal *et al.*, 2015).

Se puede suponer que los medios de cultivo diseñados para *O. oeni* que poseen características enológicas dan peores resultados de crecimiento que los medios de cultivo desarrollados en laboratorio, ya que tienen menos cantidad de nutrientes añadidos, sin embargo, Hayman & Monk (1982) evaluaron la adición de vino al medio y llegaron a la conclusión de que un 40 - 80% de vino añadido induce a la mejora de la supervivencia de las BAL.

La información aportada a través de los diferentes estudios revisados, sugiere que *O. oeni* tiene gran cantidad de requerimientos nutricionales que pueden ser variables en función de la cepa (Terrade *et al.*, 2009).

El campo de la genética podría abrir nuevas puertas acerca de las condiciones de cultivo que hagan favorable el crecimiento de *O. oeni*. Se han realizado estudios sobre su fisiología y bioquímica, así como estudiado su secuenciación genómica, pero a pesar de ello aún no se tiene mucha información genética de la especie (Bartowsky, 2005).

2.2. Revisión de medios de cultivo descritos en la bibliografía

La búsqueda de un medio de cultivo general para diferentes cepas de este microorganismo comienza por la revisión y comparación de los resultados obtenidos por los diferentes autores en los distintos medios de cultivo. En la bibliografía se pueden encontrar los medios de cultivo para *O. oeni*, que se detallan a continuación en la tabla 1.

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para el cultivo de *Oenococcus oeni*.

Medio de cultivo	Autor/es
GPYA (Glucose-Peptide-Yeast extract Agar)	Berbegal, C., 2014
MRS (de Man Rogosa Sharpe)	De Man, Rogosa & Sharpe, 1960
PCA (Plate Count Agar)	Berbegal, C., 2014
AGB (Acidic Grape Broth)	Dicks & van Vuuren, 1990
MRS/TJ	De Man, Rogosa & Sharpe (1960)/Tomate juice broth (Difco)
NA (Nutrient Agar)	-
HHD (Homofermentative Heterofermentative Differential)	McDonald <i>et al.</i> , 1987
M5	Zúñiga, M., Pardo, I., & Ferrer, S., 1993
MLO (Medium for <i>Leuconostoc oenos</i>)	Claus <i>et al.</i> , 1983
MLO	Caspritz & Radler, 1983
MLO	Zúñiga, M., Pardo, I., & Ferrer, S., 1993
OPM (<i>Oenococcus</i> Production Medium)	Berbegal, C., 2014
Terrade	Terrade <i>et al.</i> , 2009
Maxo1	Gutiérrez Hernández, G.D., 2015
Maxo2	Gutiérrez Hernández, G.D., 2015
MaxoR	Gutiérrez Hernández, G.D., 2015

Entre todos los medios descritos en la bibliografía para el crecimiento de BAL, el medio MLO se encuentra en la actualidad entre los más utilizados por diversos autores. Se encontraron diferentes composiciones para este medio, sin embargo, se basan en la misma composición diferenciándose en algunas mejoras. El protocolo de Claus *et al.*, (1983), fue uno de los primeros que se propusieron junto con el de Caspritz & Radler, de ese mismo año. A partir de estos dos medios, los demás autores se basan en estas referencias, proponiendo en ocasiones alguna modificación. Es el caso del medio diseñado por Zúñiga, M., Pardo, I., & Ferrer, S. en 1993, que es igual que el de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), sólo se diferencian en la utilización de la natamicina, que es el componente añadido como mejora por Zúñiga *et al.*, (1993) cuando se realiza el aislamiento de la bacteria a partir de vino donde están presentes otros microorganismos. La población bacteriana que se puede alcanzar con este medio es de 10^6 - 10^8 ufc/ml (Maicas *et al.*, 2000), lo que justifica que sea uno de los medios más ampliamente utilizados. El MLO se ha empleado como medio de crecimiento para diversas cepas de *O. oeni* (CECT M42, G6, N172, T46 y M41), las cuales fueron aisladas e identificadas por Pardo y Zúñiga en 1992, provenientes de la zona de Requena (España). Entre todas estas cepas estudiadas en bibliografía, la que mejor adaptación muestra en condiciones enológicas es la G6, que podrá usarse como cultivo iniciador para la FML (Maicas *et al.*, 2000). Para dicho medio y a través de Pardo y Zúñiga (1992), se aislaron las cepas MA4 y VV5 en vinos españoles, que serían utilizadas en posteriores trabajos con autores como Maicas *et al.*, en 1999. Con estas cepas se alcanzaron en unas 2 - 3 semanas una población bacteriana de la cepa VV5 y la cepa M4 de 3×10^9 ufc/ml y 3×10^7 ufc/ml respectivamente. Otras cepas empleadas fueron la E5003, E5067, E5259 y E5245, que alcanzaron en su fase estacionaria un total de 1×10^6 ufc/ml (Zúñiga *et al.*, 1993). Otros autores revisados en bibliografía que trabajaron con este medio fueron Landete *et al.*, en 2007 y Ruíz *et al.*, en 2010. Estos datos sugieren que el MLO es un medio que muestra buenos resultados de crecimiento bacteriano.

El medio MRS también ha sido empleado con frecuencia para el cultivo de BAL, a través de autores como Navarro *et al.*, en el año 2000, aunque no tanto para *O. oeni*. Por esto se han encontrado pocas cepas de esta bacteria que hayan sido utilizadas para crecer en este medio, como *O. oeni* Uvaferm Alpha, de la casa comercial Lallemand. Esta cepa, cultivada en MRS, se inmovilizó mediante encapsulación en un hidrogel basado en PVA (LentiKats®), llegando a una concentración de $6,5 \times 10^9$ ufc/mg gel (Rodríguez-Nogales *et al.*, 2012).

El zumo de tomate ha sido desde hace mucho tiempo uno de los componentes más utilizados para aumentar el crecimiento en los medios de cultivo para bacterias lácticas. Por ello, se puede considerar una modificación del MRS el medio MRS/TJ, que consta de la mezcla al 50% del medio MRS (De Man, Rogosa & Sharpe, 1960) con zumo de tomate de la casa comercial Difco (Detroit, USA). A pesar de la amplia búsqueda bibliográfica, los autores que trabajan con este medio (Campos *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 1986) no especifican mucho sobre la población que puede alcanzar la bacteria, pero se sabe que al cuarto día las bacterias están en fase estacionaria, es decir, que alcanzan su máximo crecimiento.

Adicionalmente, se pueden encontrar en la bibliografía otros medios de cultivo utilizados para esta bacteria.

El medio de cultivo AGB (Dicks & van Vuuren, 1990), permite una cantidad de células viables alrededor de $2,5 \times 10^6$ ufc/ml a las 36 horas de crecimiento. Autores como Van Reenen *et al.*, en 1998, trabajaron con cepas como ML34, 19CI, NLO-09, DSM 7008. Otros ensayos se realizaron con distintas cepas de *O. oeni* de la NCDO (National Collection of Dairy Organism), aisladas a partir de vinos de diferentes zonas geográficas

(Sudáfrica, Francia, Italia, California, Japón...), (Dicks *et al.*, 1990). Este medio también fue utilizado por Zapparoli *et al.*, en el año 1998.

Los estudios realizados con 40 cepas de *O. oeni* de la colección de Enolab, que fueron aisladas a partir de vinos tintos que realizaron la FML de forma espontánea en el medio OPM, indican que en este medio se alcanza una población bacteriana alta, siendo esta de 1×10^9 ufc/ml en 6 días. También permite una buena adaptación de la bacteria a las condiciones del vino. Hay que destacar la inclusión en la composición del medio de componentes como vino y mosto de uva.

Los medios HHD (McDonald *et al.*, 1987) y M5 (Zúñiga, M., Pardo, I., & Ferrer, S., 1993) se emplearon como medios para la diferenciación entre bacterias homofermentativas y heterofermentativas, señalando la mayor efectividad de éste último para ello. El HHD está basado en el medio MD (Malate Decarboxylating) de Daeschel *et al.*, (1983) pero cuenta con algunos cambios en el mismo como la sustitución de glucosa por fructosa, la presencia de KH_2PO_4 , y la eliminación del ácido málico. Contiene verde de bromocresol como indicador de pH, el cual permite teñir de verde el medio inoculado con bacterias homofermentativas (que pasan de azul a verde), y de azul si se inocula con heterofermentativas (que anteriormente eran blancas).

El medio M5 (Zúñiga, M., Pardo, I., & Ferrer, S., 1993) está formado en base al MLO (Claus *et al.*, 1983) y cuenta con algunas modificaciones como son la adición de fosfato de potasio, pantotenato de calcio y fructosa. La omisión de glucosa, zumo de tomate y citrato de diamonio y verde de bromocresol resultan poco efectivos para el crecimiento de *O. oeni* ya que la bacteria necesita más de 10 días para crecer. Las cepas utilizadas para estos medios fueron obtenidas por aislamiento de las mismas en vinos, o directamente de la CECT.

El resto de medios de cultivo que figuran en la tabla anterior, PCA y GPYA (Berbegal, C., 2014), Terrade (Terrade *et al.*, 2009), y Maxo1, Maxo2 y MaxoR (Gutiérrez Hernández, G.D., 2015), no han sido encontrados con tanta frecuencia y los datos indican que no son eficaces para el crecimiento de *O. oeni*, apenas hay crecimiento o, si lo hay, es muy pobre como en el caso del medio HHD. Este es el caso de los medios PCA y GPYA (Berbegal, C., 2014), genéricos para bacterias y levaduras y hongos respectivamente. No se han encontrado más referencias sobre estos medios para el cultivo de *O. oeni* en bibliografía, ya que tiene poco uso para el crecimiento de nuestra bacteria estudio.

Lo mismo ocurre con los medios Terrade (Terrade *et al.*, 2009), y Maxo1, Maxo2 y MaxoR (Gutiérrez Hernández, G.D., 2015). El medio Maxo2 se creó en base al Maxo1. Se diferencian entre ellos en la utilización de glutamicina y ribosa en el caso de Terrade y en los demás no, y la presencia de glutamina, ácido cítrico, ácido málico, fructosa, glucosa y Tween 80 en los tres últimos y no en el primero. También hay alguna modificación en las cantidades utilizadas para los medios Maxo1, Maxo2 y MaxoR en componentes como la valina, la glucosa y la fructosa. Para estos medios se trabajó en bibliografía con cepas *O. oeni* PSU-1 y VP41, ambas de la casa comercial Lallemand.

Por último, el medio NA. La diversidad de bibliografía consultada no cita al autor en este medio, limitándose a hacer referencia a lo poco que se ha utilizado para el crecimiento de *O. oeni* por tratarse de un medio genérico para todo tipo de bacterias.

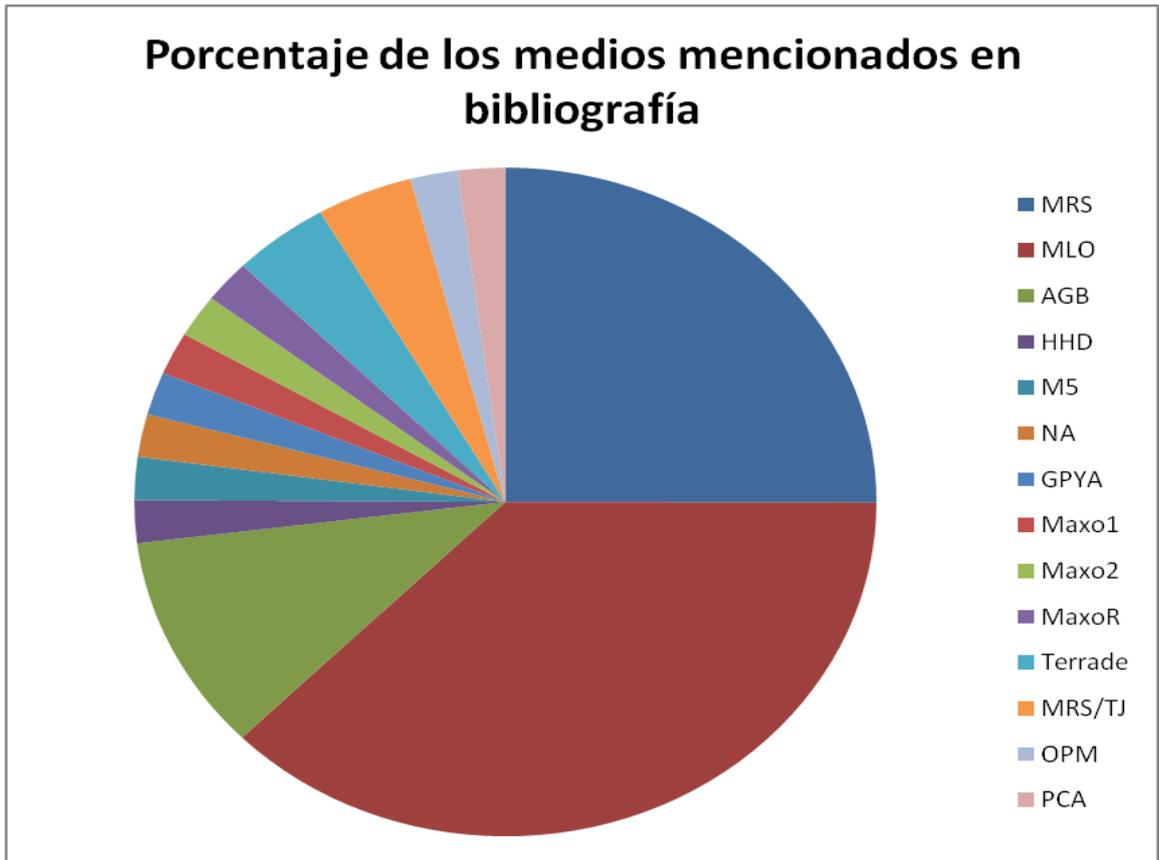


Figura 1. Utilización de los medios de cultivo (expresados en %) para la bacteria *Oenococcus oeni* encontrados en la revisión bibliográfica.

3.- Justificación

Actualmente, *Oenococcus oeni* es la bacteria láctica más empleada en vinos para realizar de forma efectiva la FML. La inoculación de esta bacteria permite controlar este proceso, realizar una FML más rápida y conferir al vino unas características deseadas.

El interés actual en la búsqueda de microorganismos que confieran características únicas al vino ha llevado a la selección de bacterias autóctonas para la elaboración de vinos. La búsqueda de un medio de cultivo general que facilite el aislamiento y desarrollo de estos microorganismos en el laboratorio es un proceso clave para esta selección.

4.- Objetivos

El objetivo principal de este estudio es la búsqueda de un medio de cultivo para el aislamiento y/o cultivo en laboratorio de *Oenococcus oeni*.

Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Revisión bibliográfica de los medios de cultivo propuestos y elección de los más adecuados para su optimización.
- Optimización de la composición para ensayos en laboratorio.

- Estudio del crecimiento de tres cepas de *O. oeni* en condiciones óptimas de crecimiento.
- Análisis de resultados y propuesta de mejoras.

5.- Materiales y métodos

5.1. Microorganismos

Se utilizaron tres cepas de *Oenococcus oeni*: CECT217 y CECT4759, ambas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y VP41 de la casa comercial Lallemand.

La cepa CECT217 fue aislada en vino por Garvie en 1967 y clasificada inicialmente como *Leuconostoc oenos* (Garvie, 1967). Posteriormente, Dicks la reclasificó como *Oenococcus oeni* (Dicks, 1995).

La cepa CECT4759, se obtuvo de la colección de Martínez-Murcia (A12) de la Universidad de Alicante, y fue aislada por A. Zavaleta de vinos de Cigales (Valladolid).

VP41 fue aislada en una región de Italia con el objetivo de obtener una cepa para realizar vinificaciones en condiciones adversas como alto grado alcohólico y bajo pH.

A lo largo del estudio también se utilizó la bacteria láctica *Lactobacillus plantarum* CECT220 y una bacteria acética *Acetobacter oeni* CECT5830 como controles en los ensayos que se requerían.

5.2. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo fueron autoclavados a 121 °C durante 15 minutos antes de su uso en los diferentes ensayos.

5.2.1. Mantenimiento de los microorganismos

Las bacterias se mantuvieron en el medio sólido correspondiente realizando pases frecuentes (aproximadamente cada 10 días). El crecimiento se realizó en anaerobiosis a 26°C. El crecimiento en medio líquido, en los ensayos donde se requería previamente, se realizó en las mismas condiciones.

El mantenimiento de *Lactobacillus plantarum* se realizó en medio MRS, caldo (Panreac, ref.: 413785. 1210) o MRS, agar (Panreac, ref.:413784. 1210), preparado según las indicaciones del fabricante.

El mantenimiento de *O. oeni* se realizó en el medio recomendado por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). En este medio se introdujo una modificación previamente utilizada por este grupo de investigación para el crecimiento de la bacteria que consistía en la sustitución del zumo de tomate filtrado por un preparado comercial (Difco ref.251720) con el objetivo de mantener siempre la misma composición.

5.2.2. Medios de cultivo estudiados

5.2.2.1. MRS

Para el estudio del medio de cultivo MRS, se propuso el descrito por De Man, Rogosa & Sharpe, de 1960, pero debido a su similitud y efectividad, se utilizó MRS, agar (Panreac, ref.:413784. 1210) y MRS, caldo (Panreac, ref.:413785. 1210). Estos medios se prepararon siguiendo las indicaciones del fabricante.

Tabla 2. Composición del medio de cultivo MRS (Dehydrated Culture Media), Panreac.

<i>Composición</i>	<i>g/L</i>
Citrato de diamonio	2
Extracto de carne	8
Extracto de levadura	4
D+ Glucosa	20
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ H ₂ O	0,05
Peptona bacteriológica	10
Fosfato de dipotasio	2
Acetato de sodio	5
Tween 80	5
Agar	10
pH	6,2 ± 0,2

5.2.2.2. MLO

Se propuso el medio de Zúñiga, M., Pardo, I., & Ferrer, S., 1993, pero debido a su similitud se utilizó el medio recomendado por la CECT con la mejora introducida en el laboratorio, preparado comercial de zumo de tomate.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo *Leuconostoc oenos* MEDIUM (MLO).

<i>Composición</i>	<i>g/L</i>
Triptona	10
Extracto de levadura	5
Glucosa	10
Fructosa	5
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,20
MnSO ₄ H ₂ O	0,05
Citrato de diamonio	3,5
L-cisteína	0,5
Zumo de tomate*	100 ml
Tween 80	1 ml
Agar	20
pH	4,8

*El zumo de tomate utilizado en laboratorio fue el de la casa comercial Difco ref.251720, en el cual se especificaba una dosis a utilizar de 41 g/L. Tanto para el medio sólido como para el líquido.

Para preparar este medio, se disuelven los ingredientes en la mitad del volumen requerido, y se ajusta el pH a 4,8. En el resto de volumen, se disuelven 20 g/L de agar. Se deben esterilizar por separado, en autoclave durante 15 minutos a 121°C, y mezclarlos asépticamente cuando aún estén calientes.

Tras el proceso de la esterilización en autoclave, se debe añadir asépticamente 10 ml de una solución al 5% (w/v) de cisteína, esterilizada por filtración con un filtro de 0,20 µm.

Para la preparación del medio líquido, se disuelven los ingredientes en el volumen requerido, y se ajusta el pH a 4,8. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Tras el proceso de la esterilización en autoclave, se debe añadir asépticamente 10 ml de una solución al 5% (w/v) de cisteína, esterilizada por filtración.

5.2.2.3. MLO modificado

Se realizaron tres modificaciones con respecto al zumo de tomate utilizado.

- a) De esta forma, en el primer cambio se utilizó un zumo de tomate natural. Se preparó a partir de un kilo de tomates comerciales, los cuales se lavaron previamente y sin quitarles la piel, se licuaron. Así siguiendo un protocolo propuesto por Zúñiga *et al.*, 1993, se obtuvo un litro de zumo de tomate, el cual se mezcló con dos litros de agua destilada y se dejó macerando a 4°C en cámara fría durante 12 horas. A continuación, se filtró con embudo y papel de filtro, para eliminar partes sólidas del zumo y se conservó en frigorífico hasta su uso.
- b) Una segunda modificación fue el uso de un zumo de tomate sin aditivos. Se utilizó el zumo de tomate de la marca Don Simón, que tiene como ingredientes zumo de tomate a partir de concentrado y sal.
- c) La última mejora fue la utilización de zumo de tomate con aditivos. Es de la marca Hacendado y contiene zumo de tomate a partir de concentrado, sal y acidulante (ácido cítrico).

Por último, tomamos como referencia un medio sin tomate, es decir, el medio MLO sin la presencia de ningún tipo de tomate o zumo del mismo para ver si la ausencia de éste afectaba o no en el crecimiento de la bacteria.

5.3. Ensayos de crecimiento bacteriano

Los ensayos de crecimiento bacteriano se realizaron en los diferentes medios sólidos y líquidos.

Los medios utilizados fueron:

MRS: MRS, agar (Panreac, ref.:413784. 1210) y MRS, caldo (Panreac, ref.:413785. 1210).

MLO (*Leuconostoc oenos* MEDIUM, CECT85); con la composición descrita en el apartado 5.2.2.2 de materiales y métodos, y variando el zumo de tomate empleado.

- Preparado deshidratado (Difco ref.251720)
- Zumo de tomate natural

- Zumo de tomate sin aditivos
- Zumo de tomate con aditivos
- Sin zumo de tomate

5.3.1. Medio sólido

Se determinó la evolución del crecimiento de las tres cepas a través de fotografías diarias tomadas a las placas. Se realizó dicho ensayo en los medios de cultivo MRS y MLO.

Para ello se hizo una siembra en estría de cada una de las cepas en distintas placas. El crecimiento se realizó a 26 °C.

5.3.2. Medio líquido: curva de crecimiento

El ensayo de crecimiento se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 100 ml con 50 ml de los diferentes medios de cultivo.

Se estudió la evolución de las tres cepas de *O.oeni* durante varios días mediante la determinación de la densidad óptica del cultivo a 600 nm usando un espectrofotómetro (Spectronic® 20 GENESYS™). Los ensayos se realizaron por triplicado tomando como referencia el medio sin inocular. El ensayo se comenzó inoculando 1 ml de los microorganismos desde un cultivo líquido a una densidad óptica a 600 nm de $1,00 \pm 0,10$. Dicho ensayo se realizó por duplicado.

El análisis de datos de la evolución del crecimiento de las diferentes cepas se representó como la media de los triplicados indicando la desviación estándar de las medidas realizadas.

5. 4. Identificación de microorganismos

5.4.1. Tinción Gram

Tanto al principio como al final de los ensayos se realizó una tinción de Gram para comprobar la presencia de bacterias lácticas. El primer paso para realizar la prueba fue la fijación de la muestra de la bacteria en un portaobjetos. La muestra se observó con el objetivo 100x aplicando aceite de inmersión en un microscopio Leica DM750 (OIV/OENO 206/2010).

Adicionalmente, se realizó una tinción simple con azul de metileno, $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot H_2O$, (Panreac), (OIV/OENO 206/2010). Es un colorante que tiñe cualquier tipo de microorganismo, no hace ninguna distinción.

5.4.2. Prueba de la catalasa

Esta prueba, al igual que la tinción Gram, se realizó para comprobar la presencia de bacterias catalasa negativas, característico de *O. oeni*.

La prueba se realizó siguiendo el protocolo descrito por la OIV (OIV/OENO 206/2010). Se puso en un portaobjetos una pequeña muestra de bacterias y se depositó sobre la muestra una gota de peróxido de hidrógeno al 30%. La liberación de gas se observó claramente a simple vista.

6.- Resultados y discusión

6.1. Elección de los medios de cultivo

Tras la revisión bibliográfica, se concluyó que los medios más utilizados para el estudio y crecimiento de *Oenococcus oeni* son MRS y MLO. De los demás se han obtenido pocas referencias, han sido utilizados en menor proporción y han dado peores resultados. También hay que tener en cuenta que la mayoría son medios muy genéricos, no son específicos para el crecimiento de *O. oeni*. Según los datos publicados, el medio MLO permite un crecimiento rápido y fácil de *O. oeni*. Por otro lado, el medio MRS aparece en la bibliografía como un medio idóneo para bacterias lácticas, especialmente para *Lactobacillus plantarum*.

El medio MRS seleccionado (Panreac, MRS, caldo ref.:413785. 1210; MRS, agar Panreac, ref.:413784. 1210), presenta una composición que se corresponde con la previamente descrita por De Man, Rogosa & Sharpe (1960) y detallada en materiales y métodos.

El medio MLO seleccionado para el estudio es el desarrollado por Zúñiga, M., Pardo, I., & Ferrer, S., (1993) al que se ha introducido una modificación que consiste en sustituir el zumo de tomate preparado (el cual se realiza mezclando 1 litro de zumo de tomate con 2 litros de agua destilada, se deja macerando 12 horas a 4°C, se centrifuga durante 20 minutos a 14000 rpm, se filtra y se conserva a -20°C hasta su uso) por Tomato Juice Broth (Difco), preparado según las indicaciones del fabricante cuya composición aporta otros nutrientes adicionales a los presentes en el zumo de tomate.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo MLO

Composición	g/L
Triptona	10
Glucosa	10
Fructosa	5
Extracto de levadura	5
MgSO₄ 7H₂O	0,2
MnSO₄ H₂O	0,05
Citrato diamónico	3,5
L-cisteína	0,5
Tween 80	1 ml
Zumo de tomate*	100 ml
Agar	20
pH	4,8

* (La dosis a utilizar era de 4,1g de tomato juice broth por litro)

Tabla 5. Composición del zumo de tomate Difco, 251720 para el medio MLO.

Composición	g/L
Base de jugo de tomate	20
Extracto de levadura	10
Dextrosa	10
K ₂ HPO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄	0,1
NaCl	0,01
FeSO ₄	0,01
MnSO ₄	0,01
pH	6,7 ± 0,2

Una vez descritos y seleccionados los medios de cultivo a utilizar, se procedió a evaluar mediante diferentes ensayos el crecimiento de *O. oeni* en laboratorio con los medios elegidos. Tras esto, en función de los resultados obtenidos, se realizará una mejora o modificación en el medio de cultivo que resulte más efectivo para la bacteria.

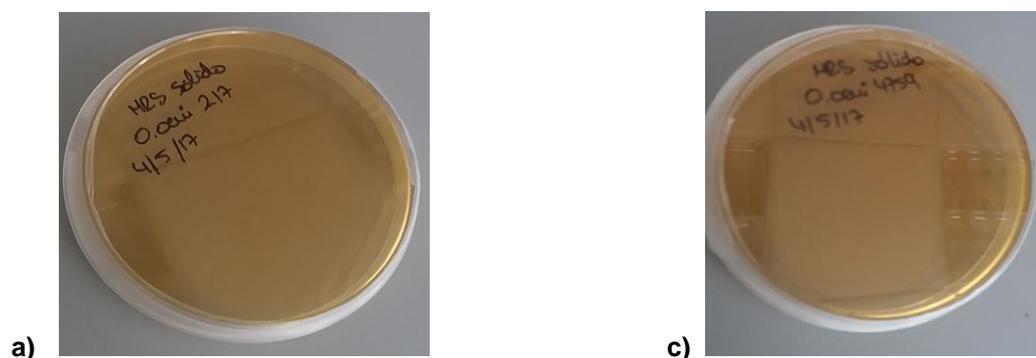
6.2. Ensayos de crecimiento bacteriano

6.2.1. MRS

Para este ensayo se tomó como control positivo de crecimiento la bacteria *Lactobacillus plantarum*, ya que es un medio idóneo para su desarrollo pero no para *Oenococcus oeni*.

Los experimentos se llevaron a cabo paralelamente en medio sólido y en medio líquido.

Los ensayos realizados sobre medio sólido muestran un rápido crecimiento de *Lactobacillus plantarum* desde el primer día de siembra, creciendo de forma más lenta los días siguientes. Sin embargo, las cepas de *O. oeni* no tuvieron apenas crecimiento durante todo el ensayo. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2.



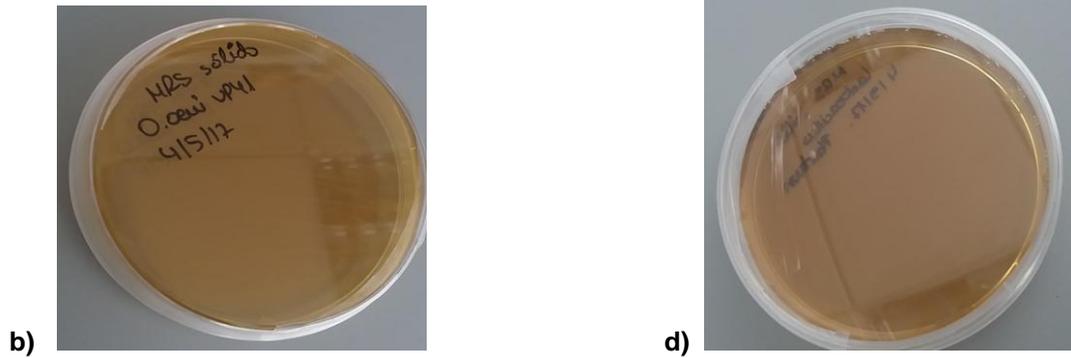


Figura 2. Máximo crecimiento de las bacterias en medio MRS sólido; a) Cepa *O. oeni* 217, b) Cepa *O. oeni* VP41, c) Cepa *O. oeni* 4759 y d) *Lactobacillus plantarum*

Paralelamente el crecimiento se monitorizó en medio líquido mediante la determinación de la absorbancia a 600 nm que presentaban los cultivos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.

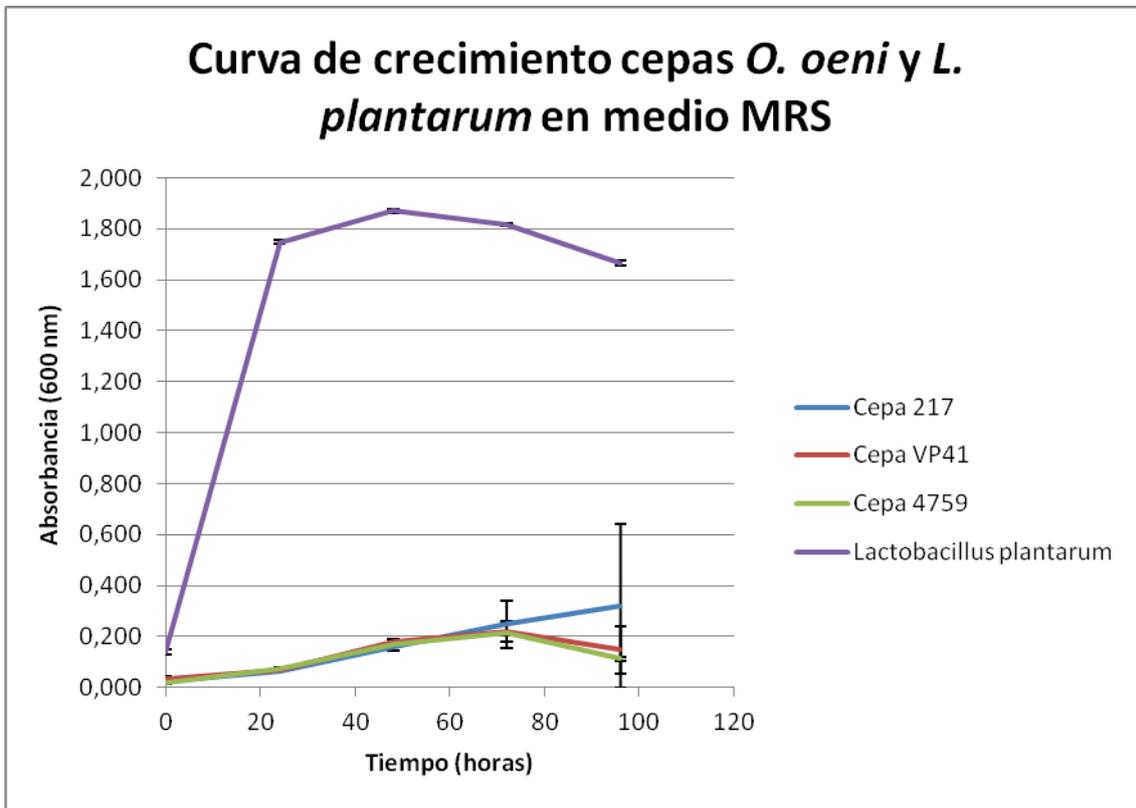


Figura 3. Comparativa de las curvas de crecimiento de las cepas *Oenococcus oeni* 217, VP41 y 4759 con *Lactobacillus plantarum* y su desviación estándar, medidas a una D.O. de 600nm durante 5 días.

Como se aprecia en la gráfica, *Lactobacillus plantarum* presenta un crecimiento adecuado en este medio tal y como se describe en la bibliografía. Sin embargo, ninguna de las tres cepas utilizadas de *Oenococcus oeni* creció adecuadamente en este medio, dando un crecimiento lento y poco significativo. Estos resultados descartan la aplicación de este medio para el aislamiento y cultivo de *O. oeni* en laboratorio.

Al tomar la bacteria *Lactobacillus plantarum* como control positivo de crecimiento, pudimos comprobar que el medio MRS es idóneo para bacterias lácticas como la citada anteriormente, pero no para *Oenococcus oeni*.

6.2.2. MLO

Al igual que en el ensayo anterior, los experimentos se realizaron paralelamente en medio sólido y líquido.

Los resultados de crecimiento en medio sólido muestran que las tres cepas crecieron al mismo ritmo, a pesar de que, como se verá en apartados siguientes, en MLO líquido la cepa 4759 crecía de forma muy lenta. Al cuarto día ya se pueden observar colonias blanquecinas en las placas, llegando al máximo crecimiento en el noveno día.

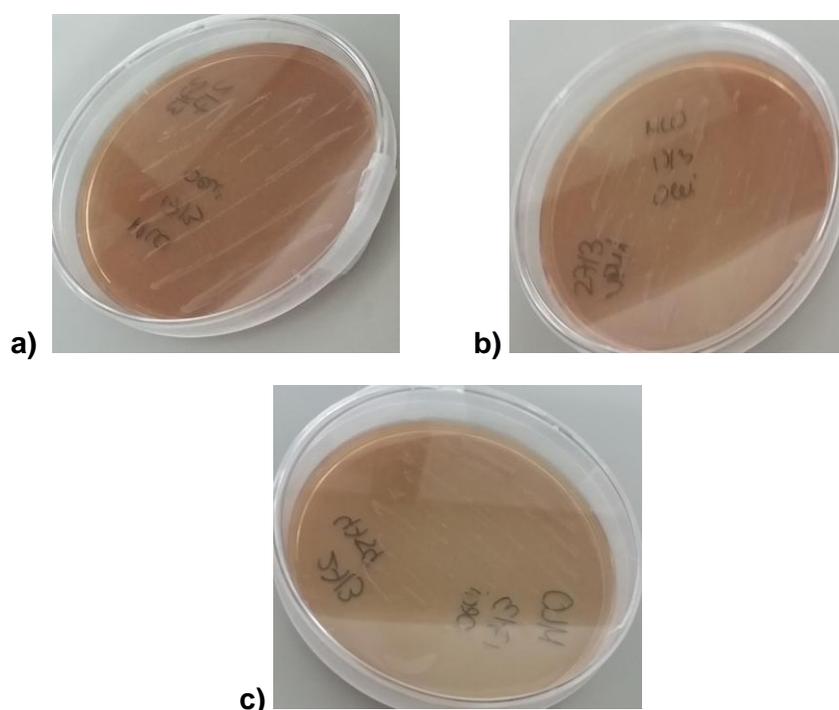


Figura 4. Máximo crecimiento de las cepas de *O. oeni* en medio MLO sólido; a) Cepa *O. oeni* 217, b) Cepa *O. oeni* VP41 y c) Cepa *O. oeni* 4759.

El crecimiento se monitorizó paralelamente en medio líquido mediante la determinación de la absorbancia a 600 nm que presentaban los cultivos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.

A pesar de realizarse por duplicado este ensayo, se muestra la curva de crecimiento del primero, ya que en esta se puede apreciar el crecimiento y decrecimiento de las cepas.

Cabe señalar que en el caso del segundo ensayo se tomaron medidas durante 6 días y no durante 7 como en el primer ensayo, para poder estudiar el comportamiento de las cepas durante la fase estacionaria de la curva.

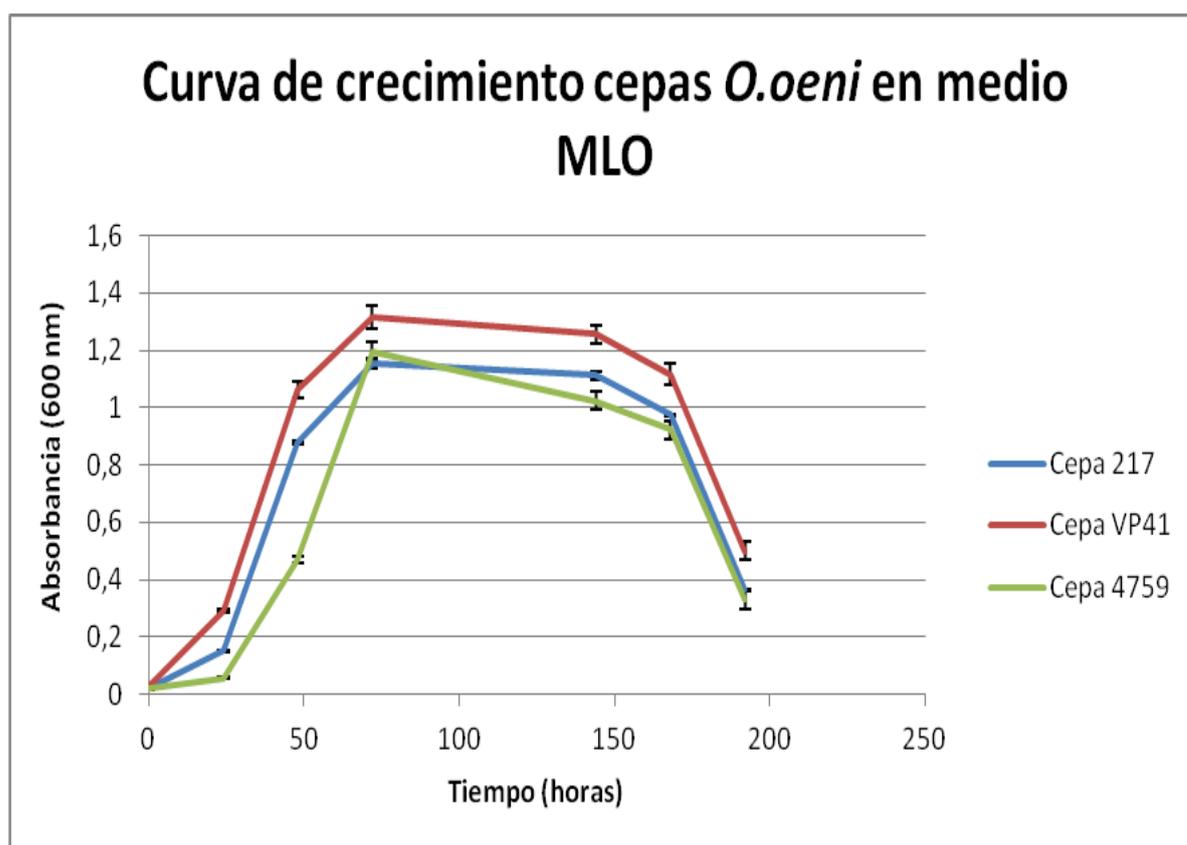


Figura 5. Curvas de crecimiento de las cepas *Oenococcus oeni* 217, VP41 y 4759 y su desviación estándar durante el primer ensayo, medidas a una D.O. de 600nm durante 7 días.

Comparando el crecimiento de las curvas de cada cepa, vemos que todas siguen una misma estructura (curva de crecimiento exponencial), creciendo así de manera más semejante la cepa 217 y la VP41 con respecto a la 4759.

O.oeni 217 consigue tomar el máximo crecimiento en el cuarto día y se sitúa en fase estacionaria la cual dura un día, a partir de este empieza a decrecer de manera progresiva.

La segunda cepa, *O.oeni* VP41, tiene un crecimiento similar a la cepa primera. La fase de crecimiento aumenta exponencialmente, alcanza la fase estacionaria que dura unos cuatro días y comienza a morir.

La última cepa, *O.oeni* 4759, es la más tardía, la cuesta más crecer en este medio que al resto, por eso no adopta una curva de crecimiento como las anteriores cepas. Crece de manera más drástica entre el tercer y cuarto día, obteniendo aquí su dato más alto, y de la misma manera las bacterias van muriendo.

Comparando la composición del medio MLO y el MRS, ya que son los más mencionados en bibliografía, vemos que el MRS es mucho más pobre en nutrientes. Cabe destacar que el MLO cuenta con dos azúcares simples (glucosa y fructosa) y el MRS sólo tiene glucosa. Según estudios bibliográficos (Zhang *et al.*, 2005), *O. oeni* consigue una mayor producción de biomasa si el medio sólo tiene como azúcar la glucosa, mientras que si el azúcar es fructosa se obtiene una fase de muerte más larga. Se comprobó que cuando el medio cuenta con una mezcla de azúcares (glucosa-fructosa), la bacteria va a tener mejores resultados de crecimiento que en presencia de un único azúcar.

Por este motivo, se espera tener mayor crecimiento en el medio MLO que en el MRS. La productividad más alta se consiguió cuando el medio contaba con la cantidad de 9 g/L de la mezcla glucosa-fructosa (1:1). Si esta cantidad baja o se aumenta, la productividad decrece. Para este estudio se utilizó la cepa NCIMB 11648, del NCIMB (National Collection of Industrial Food and Marine Bacteria, Aberdeen, UK), aislada a partir de vino.

6.2.3. MLO modificado

Una vez obtenidos los resultados del medio MLO y viendo el buen crecimiento que tomó en él las cepas de *O. oeni*, se hicieron unas modificaciones en el mismo para comprobar la evolución de estas cepas con dichos cambios.

Estas modificaciones se realizaron por motivos como el alto precio que tienen en el mercado los preparados comerciales o la necesidad de implantar este tipo de nutrientes adicionales en el medio de cultivo comercial, si realmente son relevantes para el crecimiento del microorganismo.

Se procedió de la misma manera que lo descrito en el apartado anterior, a evaluar el crecimiento en medio sólido y medio líquido.

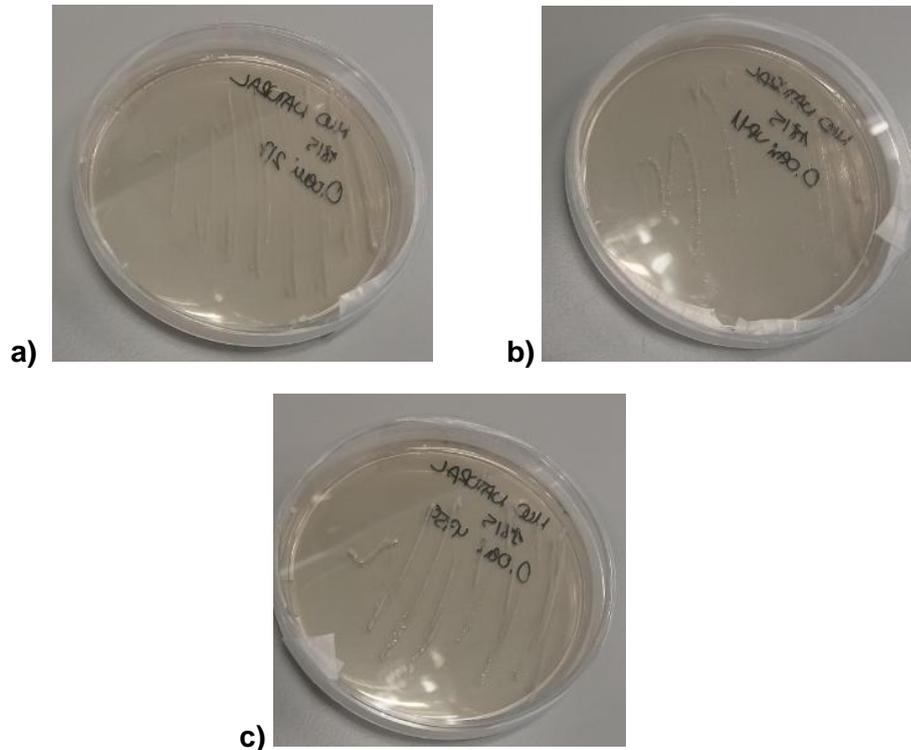


Figura 6. Máximo crecimiento de las cepas *O. oeni* en medio MLO natural sólido; a) Cepa *O. oeni* 217, b) Cepa *O. oeni* VP41 y c) Cepa *O. oeni* 4759.

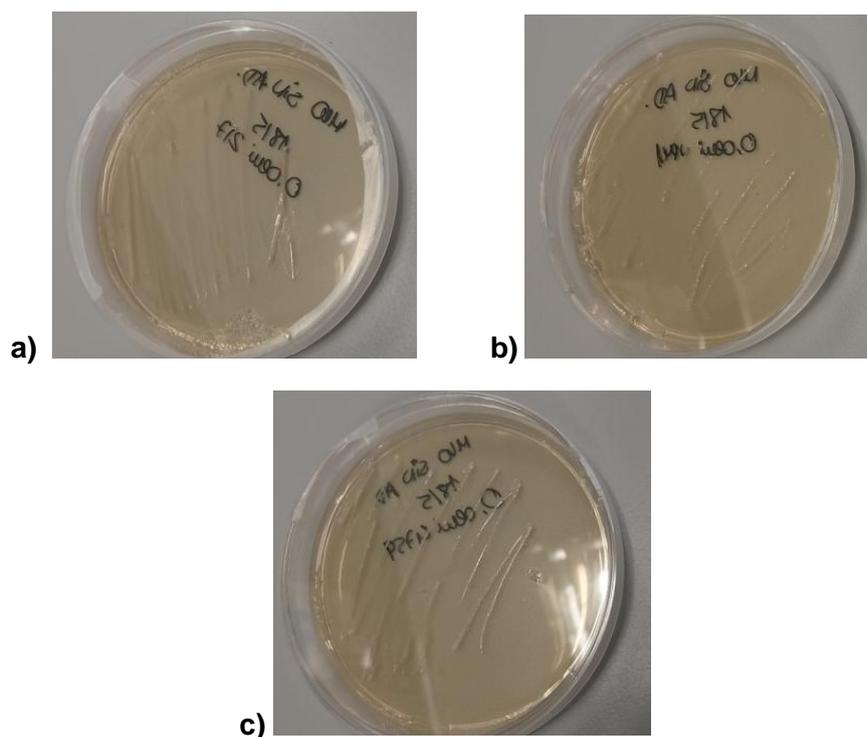


Figura 7. Máximo crecimiento de las cepas *O. oeni* en medio MLO sin aditivos sólido; a) Cepa *O. oeni* 217, b) Cepa *O. oeni* VP41 y c) Cepa *O. oeni* 4759.

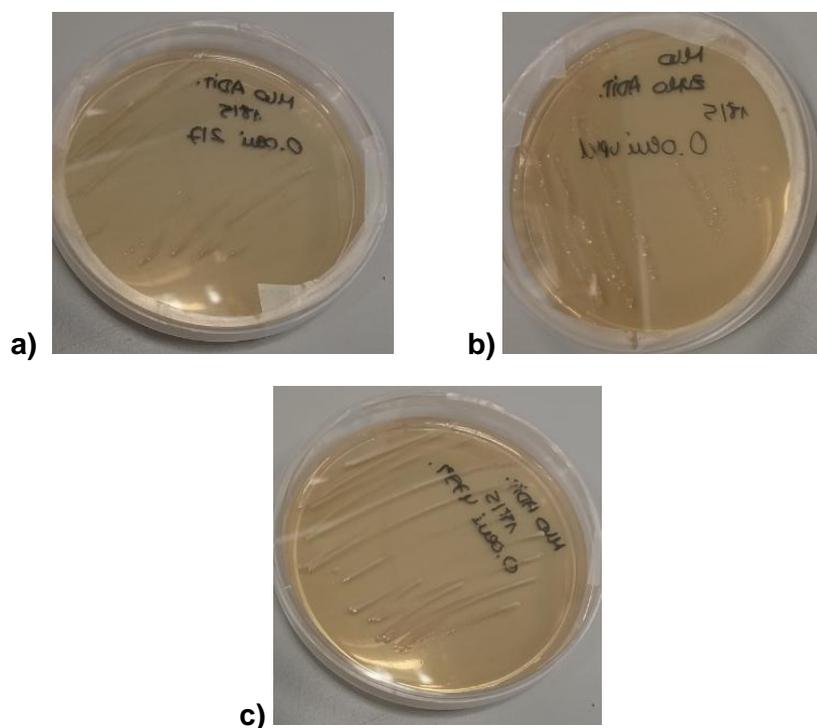


Figura 8. Máximo crecimiento de las cepas *O. oeni* en medio MLO aditivos sólido; a) Cepa *O. oeni* 217, b) Cepa *O. oeni* VP41 y c) Cepa *O. oeni* 4759.

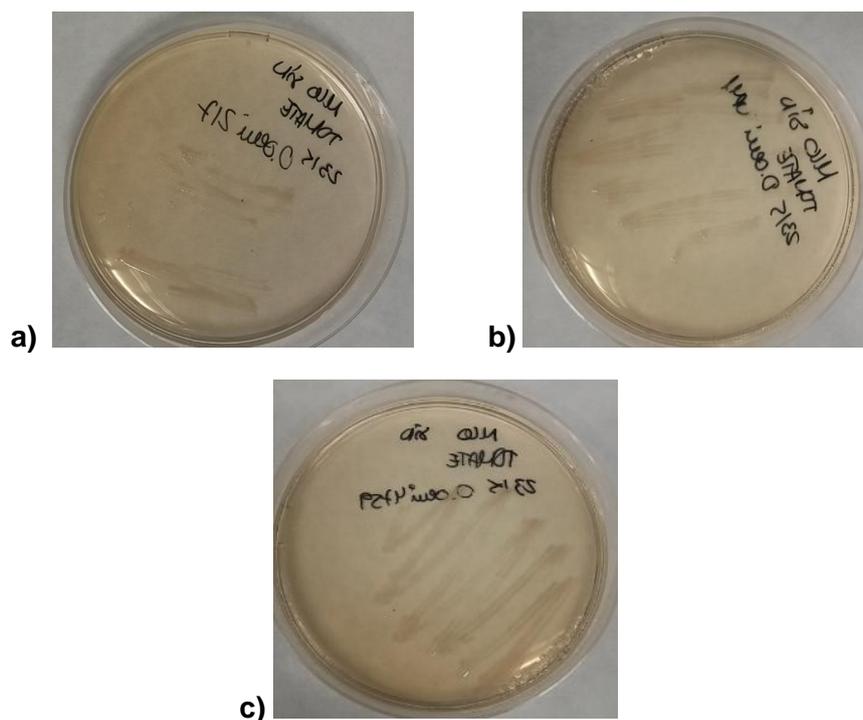


Figura 9. Máximo crecimiento de las cepas *O. oeni* en medio MLO sin tomate sólido; a) Cepa *O. oeni* 217, b) Cepa *O. oeni* VP41 y c) Cepa *O. oeni* 4759.

Las fotos del medio MLO realizadas durante este ensayo como control de crecimiento, dieron los mismos resultados de evolución que en el ensayo anterior (figura 4).

El crecimiento no ha variado mucho con respecto al zumo de tomate utilizado ya que crecen prácticamente igual. En todos ellos, al cuarto día se veía un claro crecimiento de las cepas, al igual que ocurre como veremos a continuación en el medio líquido. Con respecto a las cepas, cabe señalar que la 4759 ha sido la que ha experimentado un crecimiento más rápido que las otras dos cepas, como también ocurre en el medio líquido.

Al mismo tiempo, se estudió el crecimiento en medio líquido mediante la determinación de la absorbancia a 600 nm que presentaban los cultivos.

A pesar de que este ensayo se realizó de la misma manera que en los dos medios anteriores, en éste caso no inoculamos 1 ml de microorganismo sino 0,5 ml y no desde cultivo líquido sino directamente desde placa, lo que hace ralentizar el crecimiento bacteriano. El ensayo se hizo por duplicado y se tomaron medidas durante 4 días.

En la figura 10 se muestran las curvas de crecimiento de las tres cepas en los medios MLO, MLO natural, MLO sin aditivos, MLO aditivos y MLO sin tomate. Sólo figuran los resultados obtenidos a las 72 horas de crecimiento, ya que es el momento en el que las cepas toman su mayor crecimiento. Durante las mediciones de los tres días anteriores, las bacterias dieron en los cinco medios de cultivo con modificaciones estudiados, un crecimiento nulo.

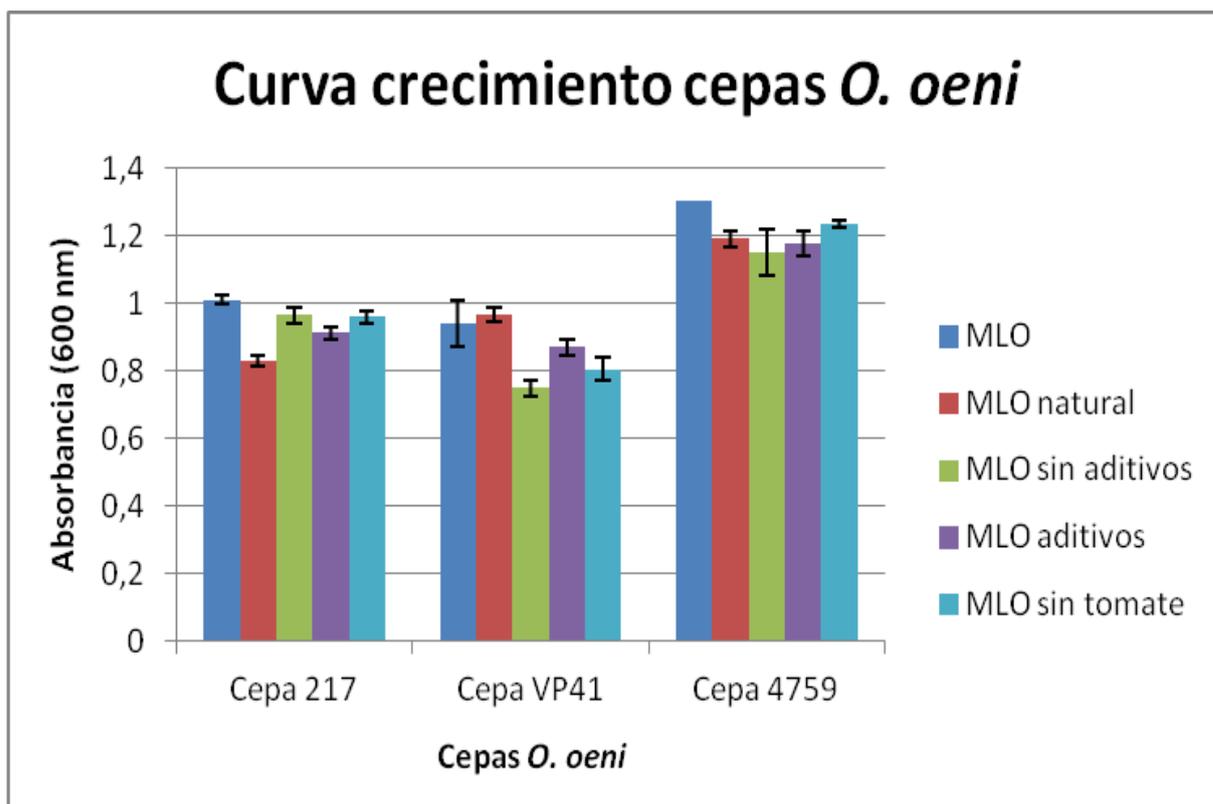


Figura 10. Curvas de crecimiento de las cepas 217, VP41 y 4759 y su desviación estándar durante el segundo ensayo, en los medios líquidos MLO, MLO natural, MLO sin aditivos, MLO aditivos y MLO sin tomate, medidas a una D.O. de 600nm.

Como se ha mencionado, las tres cepas experimentaron la misma curva, teniendo crecimiento casi nulo durante las primeras 48 horas. El último día de medición, a las 72 horas, dan un pico elevado en los tres casos, obteniendo así su máximo crecimiento.

Con respecto a la cepa 217, vemos que el medio en el que mejor crece es el MLO, de manera similar crece en el MLO sin aditivos y MLO sin tomate, mientras que en el MLO natural y MLO aditivos crece más despacio. La cepa VP41 tiene menor crecimiento en los medios MLO sin aditivos, MLO aditivos y MLO sin tomate, y crecen mejor en MLO y MLO natural. Por último, la cepa 4759 ha sido la que más rápido ha crecido y ha tenido datos más elevados. Se comporta de manera similar a la primera, los medios modificados son los que le proporcionan menor crecimiento, y en el MLO crece más rápido. A grandes rasgos, el medio más idóneo para estas cepas es el MLO, sin ninguna modificación.

Tras estudiar los medios de cultivo MRS y MLO para la bacteria láctica *O. oeni*, se concluyó que el medio que favorece el crecimiento bacteriano es el MLO, ya que el primero sólo es viable para otras BAL, como por ejemplo la estudiada como crecimiento positivo *Lactobacillus plantarum*, y para nuestra bacteria el crecimiento es casi nulo tanto en medio sólido como líquido, para cualquiera de las tres cepas estudiadas.

Por el contrario, el MLO dio buenos resultados de crecimiento. En medio sólido crecieron las tres cepas a las 72h de su siembra, al igual que en medio líquido, donde se obtuvo su máximo crecimiento en el cuarto día. En este caso, las cepas presentan casi la misma curva, siendo la VP41 la que consigue mayor crecimiento y la 4759 la más tardía.

Al mejorar el medio MLO añadiéndole diferentes preparados de zumos de tomate, se observó que el crecimiento de la bacteria no experimenta grandes cambios. Al igual que el MLO, en medio sólido a partir del cuarto día hay bastantes colonias, y en este caso, la cepa 4759 es la que presenta mayor crecimiento y más rápido en los diferentes medios. En medio líquido, la cepa 217 tiene más subida en el medio MLO con zumo de tomate sin aditivos, y en el que crece peor es en el MLO con zumo de tomate natural, cabe señalar que en los medios modificados crece menos que en MLO.

La segunda cepa, VP41, se comporta al contrario, crece más en el MLO natural (casi igual que en MLO) y tiene su dato más bajo con el MLO sin aditivos.

La última cepa, 4759, tiene más evolución en los medios modificados que en el MLO, siendo el más alto en MLO natural y el menor en MLO sin aditivos.

A pesar de que en bibliografía se describieron la mayoría de los medios de cultivo para *O. oeni* con presencia de zumo de tomate por ser un gran aporte de nutrientes (Terrade *et al.*, 2009), si prescindimos de este componente, se comprueba que el ritmo de crecimiento no sufre ninguna variación con respecto a los medios en los que se ha empleado dicho componente. Tanto en medio sólido como líquido a las 72 horas de su inoculación, las tres cepas experimentan su mayor crecimiento. La cepa que tiene menos crecimiento en este medio con respecto a los demás es la VP41, mientras que la 217 y la 4759 crecen casi igual que en el resto de medios, siendo la última la que lo hace a más velocidad.

Por ello, concluimos que las tres cepas estudiadas (CECT217, CECT4759 y VP41) no tienen crecimiento en medio MRS. Ello puede ser debido a la escasez de nutrientes presentes en el mismo. Por otro lado, presentan una buena y rápida producción de biomasa en medio MLO. Si hacemos modificaciones con el zumo de tomate que contiene este medio, no experimentan grandes cambios en las curvas de crecimiento, ninguna de las tres cepas. Si omitimos este aporte nutricional, comprobamos que sigue habiendo crecimiento bacteriano. Esto hace concluir que para las cepas estudiadas, hay suficientes nutrientes en el medio MLO, los cuales hacen que el aporte nutricional del zumo de tomate en el mismo no sea relevante.

Según lo revisado en bibliografía, se comprobó que *O. oeni* crece mejor en medios con mezcla de azúcares que en medios con azúcares simples. Cabe señalar, que el medio MRS utilizado presenta un único azúcar (glucosa) y el MLO, y todas sus modificaciones, cuentan con mezcla glucosa-fructosa. Por ello, y tras este estudio, sería interesante investigar en medios de cultivo para *O. oeni* con la presencia de una mezcla de azúcares o sólo de un azúcar, y posibles mejoras en sus composiciones.

Actualmente, los medios de cultivo descritos para esta bacteria en los que el crecimiento y la velocidad de la misma son buenos, cuentan con desventajas en la inoculación por tener características distintas a las intrínsecas del vino (Berbegal, 2014). Aquí está el problema de estos medios; en la práctica, cuando se inocula la bacteria para inducir o ayudar a la FML, se debe aclimatar previamente la temperatura a la que se encuentra el medio con la del vino, ya que las condiciones no son iguales.

Con respecto a los que han sido diseñados específicamente para esta bacteria, el único capaz de dar los resultados esperados ha sido el medio OPM, el cual se está comercializando por la empresa Agrovín, bajo el nombre de Viniferm OE104. Los otros 4 medios restantes, Terrade, Maxo1, Maxo2 y Maxo R, según los datos obtenidos en la bibliografía, no dieron los resultados esperados por lo que se debe seguir diseñando estrategias para maximizar el crecimiento de la bacteria en condiciones enológicas. Aquí se abre una posibilidad como futuros estudios, para la producción de cultivos iniciadores de la FML.

6.3. Identificación de microorganismos

El seguimiento de los microorganismos presentes en los cultivos se realizó a lo largo de los diferentes ensayos mediante observación al microscopio en fresco (datos no mostrados) o tras tinción diferencial de Gram (figura 11) o tinción simple con azul de metileno (figura 12).

Los resultados permiten ver a microscopio las lactobacterias de color azul-violeta (grampositivo) cuando realizamos la tinción de Gram y azul cuando se realiza la tinción simple con azul de metileno. En todas las visualizaciones a microscopio las tres cepas aparecen en forma de cocos pequeños, a veces formando cadenas.

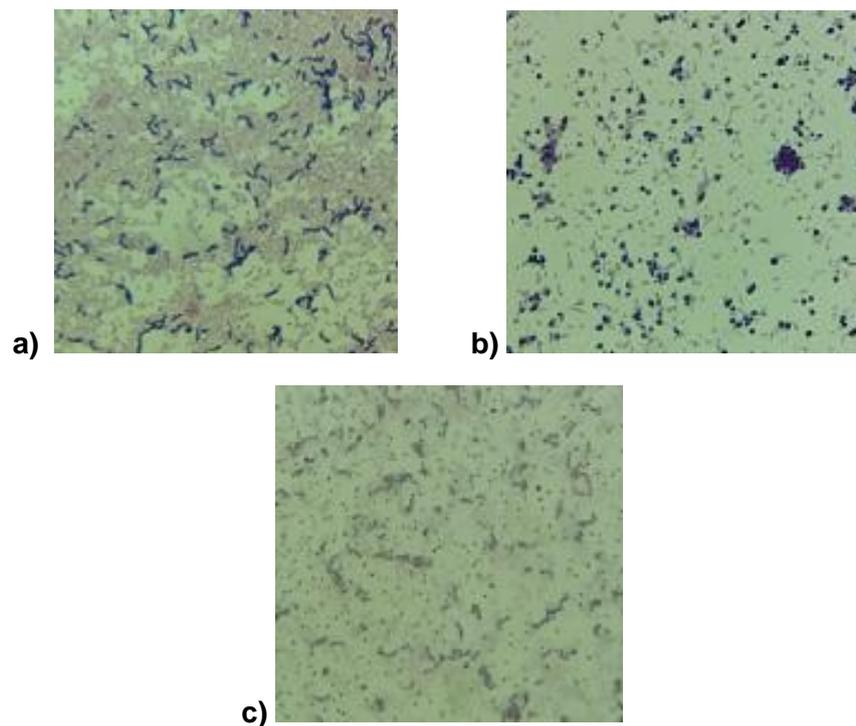


Figura 11. Visualización a microscopio de las cepas de *O. oeni* con tinción Gram; a) Cepa *O. oeni* 217, b) Cepa *O. oeni* VP41 y c) Cepa *O. oeni* 4759.

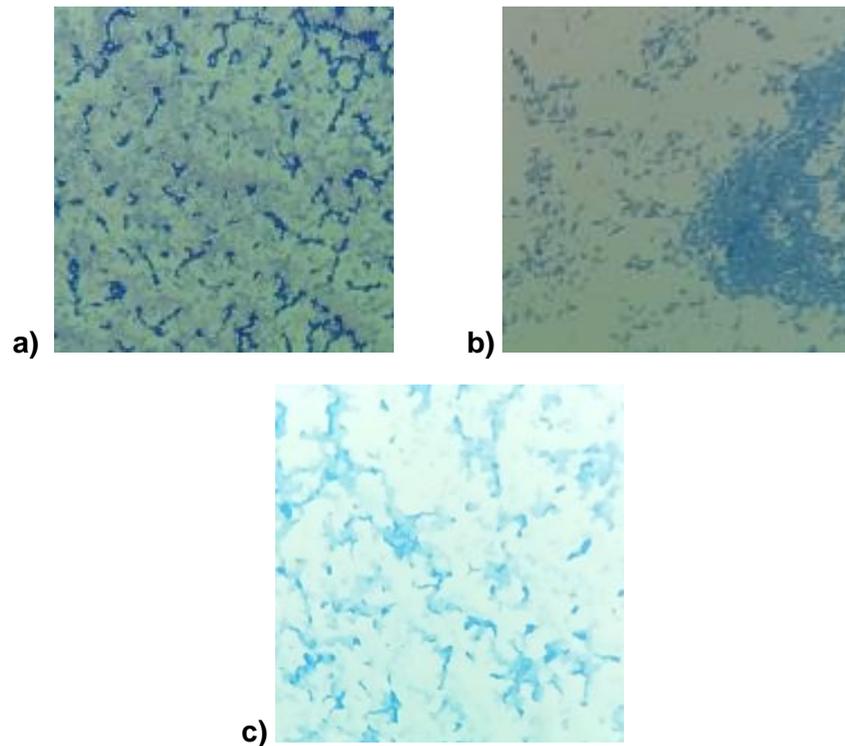


Figura 12. Visualización a microscopio de las cepas de *O. oeni* con tinción de azul de metileno; a) Cepa *O. oeni* 217, b) Cepa *O. oeni* VP41 y c) Cepa *O. oeni* 4759.

Adicionalmente, se realizó la prueba catalasa. El principio de dicha prueba se basa en la capacidad que poseen los microorganismos aeróbicos para descomponer el peróxido de hidrógeno que se les añade y liberar de esta manera oxígeno. Las lactobacterias no son capaces de llevar a cabo esta reacción y por lo tanto no forman burbuja, son catalasa negativa; al contrario que las bacterias acéticas y levaduras, que son catalasa positiva (OIV/OENO 206/2010).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9, confirmando que las tres cepas de *O. oeni* tienen actividad negativa de la catalasa, y por lo tanto, son bacterias lácticas.

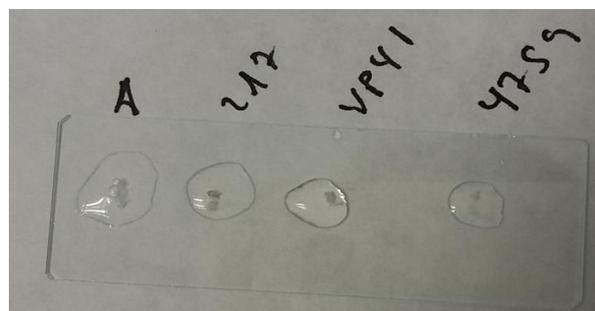


Figura 13. Resultados de la prueba de la catalasa realizada a las cepas *O.oeni* 217, VP41 y 4759, tomando como referencia positiva la bacteria *Acetobacter oeni* CECT583.

7.- Conclusiones

Tras la revisión bibliográfica y los ensayos realizados en laboratorio las conclusiones de este estudio se resumen a continuación:

1. El medio MRS no resulta adecuado para el desarrollo de *O. oeni*. Abre la posibilidad de realizar futuros estudios con nutrientes añadidos a este medio.
2. El medio MLO es idóneo y adecuado para el crecimiento y buen desarrollo de *O. oeni*.
3. Los medios modificados en base al MLO nos permitieron comprobar que el zumo de tomate no parece ser necesario en su composición. Necesidad de futuros estudios sobre requerimientos nutricionales de *O. oeni*.

8.- Bibliografía

- Bartowsky, E. J. (2005). *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 174–187.
- Berbegal, C. (2014). Novel liquid starter cultures for malolactic fermentation in wine. (Ph. D. thesis) (pp. 81-91). Valencia, Spain: Department of Microbiology and Ecology, University of Valencia.
- Berbegal, C., Benavent-Gil, Y., Pardo, I. & Ferrer, S. (2015). A novel culture medium for *Oenococcus oeni* malolactic starter production. *Enolab*, Universidad de Valencia. Elsevier.
- Bordons, A., Reguant, C. Bioquímica de las bacterias lácticas del vino y la fermentación maloláctica. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBB). Revista: Bioquímica del vino.
- Campos F.M., Couto J.A., Hogg T.A. (2003). Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. Hogg Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal.
- Castellucci, F. (2010). Análisis microbiológico de vinos y mostos – Revisión de la resolución OENO 8/95. Resolución OIV/OENO 206/2010.
- Claus, D., Lack, P. and Neu, P. (1983). D.S.M. Catalogue of strains. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.
- Daeschel, M. A., McFeeters, R.F., Fleming, H.P., Klaenhammer, T.R. and Sanozky, R.B. (1984). Mutation and selection of *Lactobacillus plantarum* strains that do not produce carbon dioxide from malate. *Applied Environmental Microbiology*.
- Davis, C. R., Wibowo, D. J., Lee, T. H. y Fleet, G. H. (1986). Growth and Metabolism of Lactic Acid Bacteria during and after Malolactic Fermentation of Wines at Different pH. *Applied and Environmental Microbiology*,
- De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 23, 130–135.
- Dicks, LMT, Dellaglio, F., Collins, M.D (1995). Proposal To Reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*.
- Dicks, LMT., van Vuuren, HJJ., Dellaglio, F. (1990). Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oeni*, as revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, DNA base compositions, and DNA-DNA hybridizations. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40:83-91.

- García-Ruiz, A. (2012). Tesis Doctoral: Efecto de los polifenoles sobre el crecimiento y metabolismo de bacterias lácticas del vino. Potencial uso como alternativa al empleo de los sulfitos durante la vinificación. Consejo Superior de Investigación en Ciencias de la Alimentación, Universidad Autónoma de Madrid.
- Garvie EI (1967). *Leuconostoc oenos* sp.nov. Journal of General Microbiology. 48(3):431-8.
- Guerrini, S., Bastianini, A., Granchi, L., Vincenzini, M. (2002). Effect of Oleic Acid on *Oenococcus oeni* Strains and Malolactic Fermentation in Wine. Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università degli Studi di Firenze.
- Gutiérrez Hernández, G.D, (2015). Tesis doctoral, Diseño y optimización de un medio de crecimiento definido para *Oenococcus oeni* en condiciones enológicas. Universidad Pontificia Católica de Santiago de Chile.
- Hayman, D.C. & Monk, P.R. (1982). Starter preparation for the induction of malolactic fermentation in wine. Food Technology Australia.
- Kelly, W.J., Asmundson, R.V. and Hopcroft, D.H. (1989). Growth of *Leuconostoc oenos* under anaerobic conditions. American Journal of Enology and Viticulture.
- Landete, JM., Ferrer, S., Pardo, I. (2007). Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. Food Control 18:1569-1574.
- Landete, JM., Ferrer, S., Pardo, I. (2005a). Which lactic acid bacteria are responsible of histamine production in wine? Journal of Applied Microbiology 99:580-586.
- Landete, JM., Ferrer, S., Polo, L., Pardo, I. (2005b). Biogenic amines in wines from three Spanish regions. Journal of Agricultural Food Chemistry 53:1119-112.
- Liu S-Q. (2002). Malolactic fermentation in wine - beyond deacidification. Journal of Applied Microbiology 92:589-601.
- Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. International Journal of General and Molecular Biology.
- Maicas, S., Ferrer, S. & Pardo, I. (2002). NAD(P)H regeneration is the key for heterolactic fermentation of hexoses in *Oenococcus oeni*. Departament de Microbiologia i Ecologia, Facultat de Biologia, Universitat de Valencia.
- Maicas, S., González-Cabo, P., Ferrer, S., Pardo, I. (1999). Production of *Oenococcus oeni* biomass to induce malolactic fermentation in wine by control of pH and substrate addition. Biotechnology Letters 21:349-353.
- Maicas, S., Natividad, Á., Ferrer, S., Pardo, I. (2000). Malolactic fermentation in wine with high densities of non-proliferating *Oenococcus oeni*. World Journal of Microbiology & Biotechnology 16: 805-810.
- Maicas, S., Pardo, I., Ferrer, S. (1999). Continuous malolactic fermentation in red wine using free *Oenococcus oeni*. World Journal Microbiology & Biotechnology 15:737-739.

- Marques, A., Duarte, A.J., Chambel, L., Teixeira, M.F., San Romão, M.V., Tenreir, R. (2011). Genomic diversity of *Oenococcus oeni* from different winemaking regions of Portugal. *International Microbiology*.
- McDonald, L.C., MeFeeters, R.F., Daeschel, M.A. and Fleming, H.P. (1987). A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Journal of Applied Environmental Microbiology* 53. 1382-1384.
- Navarro, L., Zarazaga, M., Saenz, J., Ruiz-Larrea, F., Torres, C. (2000). Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *Journal of Applied Microbiology* 88:44-51.
- Parra, R.A., (2010) Review. Bacterias Acido Lacticas: papel funcional en los alimentos. Grupo de Investigación en Química y Tecnología de los Alimentos, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.
- Rodríguez-Nogales, J.M., Vila-Crespo, J., Fernández, E. (2012). Immobilization of *Oenococcus oeni* in LentiKats® to develop Malolactic Fermentation in wines. Immobilization of *Oenococcus oeni* in LenticatsV R to Develop Malolactic Fermentation in Wines. Universidad de Valladolid. Wiley Online Library.
- Romero, EG; Feliú, JAT; Gascueña, JM; Vozmediano, LC; Martínez, AG; Cañas, PMI. (2003). Identificación y selección de bacterias lácticas de interés enológico y comercial para su aplicación a la mejora de la calidad de los vinos tintos de Castilla la Mancha. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias.
- Ruiz, P., Izquierdo, PM., Seseña, S., Palop, ML. (2010). Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results. *International Journal Food Microbiology* 137:230-235.
- Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A. & Pretorius, I.S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*.
- Terrade, N., Mira de Orduña, R. (2009). Determination of the essential nutrient requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*. *International Journal Food Microbiology* 133:8-13.
- Van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T., Chikindas, M.L. (1998). Isolation and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*.
- Zapparoli G., Torriani S., Pesente P., Dellaglio F. (1998). Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Letters in Applied Microbiology*, 27: 243-246.
- Zhang, D. & Lovitt, R.W. (2006). Review strategies for enhanced malolactic fermentation in wine and cider maturation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81:1130- 1140.
- Zhang, D.S. & Lovitt, R.W. (2005). Studies on growth and metabolism of *Oenococcus oeni* on sugars and sugar mixtures. *Journal of Applied Microbiology*.

- Zuñiga, M., Pardo, I., Ferrer, S. (1993). An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. Departament de Microbiologia, Facultat de Ciències Biològiques, Universitat de València, Spain.