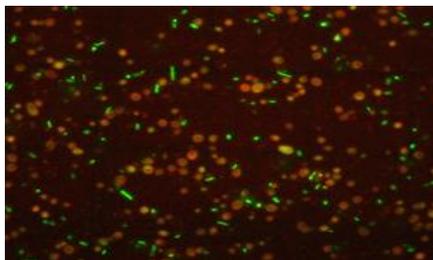


UNIVERSIDAD DE VALLADOLID. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

ESTUDIO Y DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN DE BACTERIAS EN VINO MEDIANTE EPIFLUORESCENCIA

LABORATORIO DOMINIO DE PINGUS S.L.



Laura Curiel Llanos
01/07/2014



El trabajo ha sido llevado a cabo por la Licenciada con Grado en Química D^a LAURA CURIEL LLANOS, realizado en el Laboratorio de Dominio De Pingus S.L. en Quintanilla de Onésimo en Valladolid y en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valladolid, bajo la dirección de: la Dra. PATRICIA BENITEZ SOTO, Directora Técnica y de Calidad del Laboratorio Dominio de Pingus S.L. y Dr. LUIS DEBÁN MIGUEL, Dr. RAFA PARDO ALMUNDI, Departamento de Química Analítica.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración de:

La Empresa DOMINIO DE PINGUS S.L. y el Laboratorio de DOMINIO DE PINGUS S.L. a los cuales deseo expresar mi agradecimiento por creer en mí y darme esta oportunidad, por toda la ayuda prestada en todo momento y su buena disposición siempre conmigo ya que en dicho lugar empezó mi inquietud sobre esta investigación, gracias a la profesionalidad de un gran grupo de personas. Mi mayor gratitud a Peter Sisseck y a Patricia Benítez por escucharme y valorarme.

El Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valladolid a los cuales agradezco su ayuda y su buena disposición en todo.

Mi especial agradecimiento a mi tutor Luis Debán por su ayuda, su paciencia, su positividad, su amabilidad, su constante apoyo siempre hacia mi persona y su confianza en mí. ¡Gracias Luis!

También quiero agradecer este trabajo a mis padres, amigos y compañeros tanto de trabajo, como de máster por haber estado ahí tanto en los malos como en los buenos momentos.

A MIS PADRES

En esta vida hay tres máximas:

“Oír, Ver y Preguntar”

Miguel Curiel Aparicio. Mi Padre

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
- 1.1 Antecedentes	6
➤ Fermentación alcohólica	6
➤ Fermentación Maloláctica	8
➤ Desarrollo de los microorganismos	9
➤ Microorganismos Detectables en vino	10
➤ Población microbiana	26
- 1.2 Objetivos y plan de trabajo	37
- 1.3 Antecedentes bibliográficos	37
2. TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS	45
➤ Epifluorescencia	45
➤ Citometria de Flujo	50
➤ PCR a tiempo Real o PCR cuantitativa	51
➤ Fluorescent in situ hybridization (FISH)	53
- 2.1 Comparativa de Técnicas	54
3. EXPERIMENTACIÓN	55
- 3.1 Cultivo en placa	55
- 3.2 Epifluorescencia	57
- 3.3 PCR a tiempo Real	59
4. RESULTADOS	68
5. CONCLUSIONES	69
6. BIBLIOGRAFÍA	70

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

Tanto la uva es su estado inicial en la viña como en sus posteriores procesos de recogida, transporte, maceración, etc...está expuesta a situaciones de contaminación por muchos y variados microorganismos. En los depósitos de fermentación, tanto los de acero inoxidable, como los tinos de manera de roble francés las condiciones del medio se modifican de forma rápida al comienzo de la vendimia. En consecuencia de todos esos microorganismos, entre los que se encuentran hongos, bacterias y levaduras, únicamente un bajo porcentaje de los mismos son capaces de mantenerse vivos, dadas las características del nuevo medio: incremento de la acidificación, variación en los azúcares y disminución apreciable de la presencia de oxígeno, por lo tanto solamente determinadas levaduras y bacterias permanecen activas en el mosto. Es en este nuevo medio de matriz altamente compleja en el que se produce de forma espontánea la fermentación, realizada lógicamente por los microorganismos a los que nos hemos referido. La fermentación, requiere de un elevado número de transformaciones de carácter bioquímico, dando lugar a la transformación de la glucosa en etanol, pero también de la transformación y origen de otros muchos compuestos. Todo esto que da las características propias de cada vino en función del proceso de vinificación y en consecuencia son el fundamento y base de la calidad de los vinos.

FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA (FA)

La fermentación alcohólica, como todos sabemos, es un proceso anaerobio en el que las levaduras son las que fundamentalmente lo realizan:



Durante esta etapa se produce un incremento apreciable de la temperatura con el consiguiente balance energético:



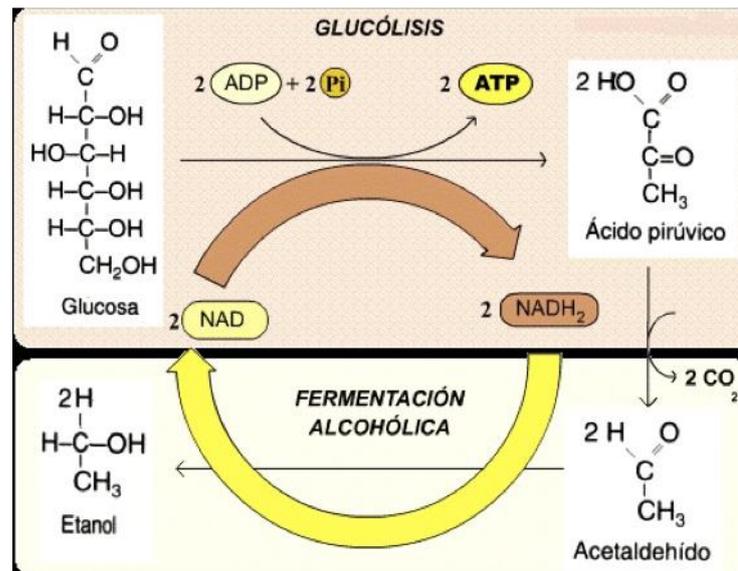


Figura 1. Ciclo de la fermentación alcohólica.

La transformación de glucosa en alcohol, como se recoge en el la **Figura 1**, implica la cesión al medio de 40 kcal, pero la formación de ATP necesita 7,3 kcal, por lo que por cada molécula de glucosa se requieren 14,6 kcal tal y como se recoge en la reacción. La energía resultante, 25,6 Kcal, es la utilizada por las levaduras para incrementar su población, lo cual condiciona positivamente la viabilidad del medio para el buen desarrollo de la fermentación alcohólica. (Usseglio-Tomasset, 1998)

Las levaduras son microorganismos mesófilos y tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 15 y 35° C, esto hace que la fermentación tenga lugar en dicho rango. Dentro de este intervalo, cuanto mayor sea la temperatura mayor será la velocidad del proceso fermentativo. Para elaborar vinos tintos es necesaria la maceración de los hollejos y pepitas de las uvas con el fin de extraer antocianos y taninos, por lo que se fermenta a temperaturas de entre 24-31°C, sin embargo para los vinos blancos la temperatura más adecuada para la fermentación se sitúa entre los 18-23°C. Por encima de 35°C el riesgo de parada de fermentación es muy elevado, ya que a estas elevadas temperaturas las membranas celulares de las levaduras dejan de ser tan selectivas. (Ward 1991).

Otro producto resultante de la fermentación es el CO₂, este es el causante del burbujeo durante el proceso de esta fermentación, con el consiguiente desprendimiento de los aromas característicos del mosto. A su vez las partes sólidas suben a la superficie, formándose una densa capa en la parte superior, llamada sombrero que protege al mosto de ataques de bacterias y de posibles oxidaciones, cediendo a su vez al mosto sustancias contenidas en dichos sólidos, como por ejemplo, taninos, antocianos, etc.. que dan características propias, tanto de color como de aroma a cada vino.

A lo largo de todo el proceso descrito, y en función de las condiciones en el medio cambia el tipo de levadura que predomina, dando lugar principalmente a tres fases en la fermentación:

- 1ª fase (primeras veinticuatro horas), predominan levaduras no *Sacharomyces*, que resisten un grado alcohólico de entre 4-5º, son sensibles al anhídrido sulfuroso.
- 2ª fase (entre el segundo y cuarto día), predominan las *Sacharomyces cerevisiae* que resisten un grado alcohólico entre 8 y 16º. En esta fase es cuando se da la máxima capacidad fermentativa.
- 3ª fase (hasta final de fermentación), sigue actuando *Sacharomyces Cerevisiae* junto a otros microorganismos.

Durante el proceso de fermentación, aparecen también otras sustancias como: - Ácido acético; - Ácido láctico; Ácido pirúvico y acetaldehído; Ácido succínico; Acetona, Diacetilo y 2-3 Butanodiol; Alcoholes Superiores, Ésteres y Acetatos; Vinil-Fenoles y Etil-Fenoles

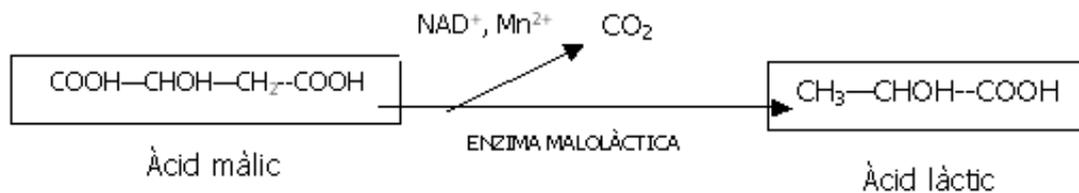
El final del proceso fermentativo alcohólico termina cuando el nivel de los azúcares es prácticamente cero y cesa el desprendimiento de CO₂.

FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA (FML)

Una vez terminada la fermentación alcohólica, se produce la fermentación maloláctica, que renueva la situación: además del ácido málico, se metabolizan numerosos compuestos del vino, debido a las bacterias.

Esta fermentación maloláctica es la transformación del ácido málico en ácido láctico (con emisión de anhídrido carbónico) por acción de bacterias lácticas principalmente por *Oenococcus oeni*.

La reacción química que ocurre es la siguiente:



Esta fermentación reduce la acidez total del vino, una parte de la acidez del vino se reduce gracias a la transformación en CO_2 , el cual se desprende y desaparece. Y la otra parte se consigue con la transformación del ácido málico (sensación de verdor y dureza) por ácido láctico (sensación más suave) que es un ácido menos fuerte que el ácido málico. El efecto final de la fermentación es elevar el pH del entorno, haciendo que sea más alcalino. La fermentación maloláctica terminará cuando el ácido málico haya desaparecido. (Nielsen, 1996).

Resumiendo, a nivel microbiológico, la vinificación es el resultado de metabolismos y de transformaciones específicas realizados por todas las levaduras y por todas las bacterias que existan durante ese proceso. Por supuesto, la calidad del vino obtenida está muy relacionada con la naturaleza de todas estas transformaciones bioquímicas.

DESARROLLO DE LOS MICROORGANISMOS

Todo microorganismo vivo utiliza toda su maquinaria celular para multiplicarse. La muestra más común de la viabilidad de un microorganismo es su capacidad de dar células hijas a partir de una célula madre. El ciclo de desarrollo de una levadura o de una bacteria comprende una *fase de latencia* durante la cual la población no aumenta, pero se adapta a las condiciones del medio.

Sigue la *fase de crecimiento exponencial* donde la multiplicación se realiza a velocidad constante: una célula bacteriana, por ejemplo, se divide en dos células hijas que inmediatamente inician un nuevo ciclo.

En un medio no renovado, como es el caso en vinificación, la población aumenta de forma exponencial hasta alcanzar una *fase estacionaria*. En este estadio, el crecimiento de la población disminuye progresivamente o se para. Las causas son varias, falta de nutrientes como el azúcar o el ácido málico, acumulación de moléculas tóxicas o la «superpoblación» es decir pueden coincidir distintas poblaciones de bacterias o de levaduras que hacen que unas impidan el crecimiento de las otras y no realicen su fin destinado (parada fermentativa por ejemplo). En este momento, una parte de la población sigue multiplicándose, mientras que otra muere. Por último, llega la *fase de decadencia* donde se da la muerte de una proporción cada vez mayor de la población y la lisis de las células.

Para efectuar este ciclo de desarrollo las levaduras y bacterias utilizan los compuestos del mosto de uva y del vino. De éstos, retiran los elementos para la síntesis de sus constituyentes. Estas reacciones proporcionan igualmente la energía sin la cual numerosas síntesis claves no serían posibles. La reserva energética de la célula es la molécula de ATP. Cualquier célula viva la contiene; a la muerte de la célula, es rápidamente hidrolizada.

MICROORGANISMOS DETECTABLES EN VINO

Para poder determinar las poblaciones de estos microorganismos que existen en el vino debemos conocerlos bien y saber que muchos de ellos son beneficiosos en distintas etapas de la vinificación y otros se encuentran como alterantes del vino.

Las fuentes de contaminación en el vino son numerosas y diversas, pero los principales focos son frecuentemente los mismos. Las alteraciones microbianas sobre el vino pueden venir de levaduras consideradas como contaminantes, como es el caso de *Brettanomyces* (producción de fenoles volátiles como etilfenol y etilguaiacol), *Zygosaccharomyces* (refermentación de azúcares residuales por la presencia de antisépticos), bacterias acéticas del tipo *Acetobacter/Gluconobacter* (producción de

ácido acético, acetato de etilo y ácidos grasos volátiles), bacterias lácticas como *Lactobacillus sp.* (producción de aminas biógenas y degradación láctica del glicerol) y *Pediococcus sp.* (producción de aminas biógenas, producción de acetiltetrahidropiridinas y producción de acroleína), entre otros. (Pilatte 2005).

Saccharomyces: levadura unicelular que se presenta en forma de una pequeña célula esférica uninucleada, de talla variable dependiendo su tamaño de cepa, de su edad y de su estado. Se multiplica por brotación.

Es la principal levadura de vinificación, lo que significa que es capaz de realizar una fermentación alcohólica completa sin producir defectos. Resiste al etanol y a concentraciones elevadas de azúcar. Es la *Saccharomyces Cerevisiae* (**Figura 2**) es la que predomina durante la fermentación alcohólica. Se encuentra esencialmente en las bodegas y sobre los materiales vinarios.

Es considerada como una levadura de alteración si la fermentación vuelve a empezar en las botellas que contienen azúcares residuales. La refermentación en la botella puede ser evitada con una buena estabilización microbiológica de los vinos (sulfuroso, filtración,..).

Esta especie es capaz de producir ácido sulfhídrico (olor de huevo podrido) vía reducción de los sulfatos. Esta capacidad y la de producir otros compuestos azufrados depende del origen de la levadura, de la composición del mosto (vitaminas, nitrógeno) y de la temperatura de la fermentación. La urea es un producto intermediario de la degradación de la arginina por esta levadura y en presencia de etanol puede entonces formarse el carbamato de etilo, tóxico para la salud.

Para eliminar la producción de compuestos sulfurados, se deben emplear levaduras seleccionadas y/o controlar los valores de nitrógeno fácilmente asimilable.

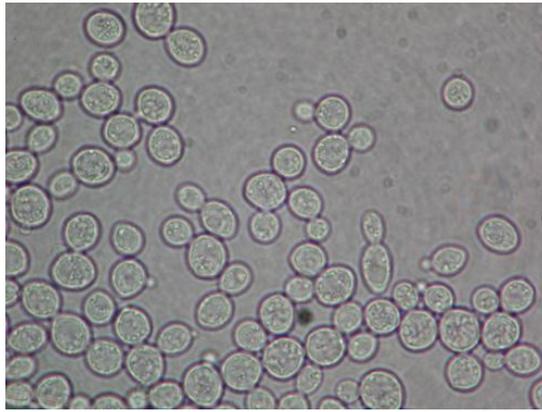


Figura 2. *Saccharomyces cerevisiae* en pleno desarrollo de la población

Zygosaccharomyces: levadura de forma cilíndrica u ovoide, de gran tamaño, con una brotación multilateral como vemos en el la **Figura 3**. Las colonias observadas sobre medio sólido son de gran tamaño.

Levadura muy fructófila y a la que no inhibe el etanol pero sí la presión osmótica por lo que no aparece en las primeras etapas de fermentación. Vive en vinos con azúcares residuales y es la gran refermentadora en la botella. Inhibe a las bacterias lácticas (también fructófilas).

Es muy común que crezcan en medios de *Brettanomyces*. Sin azúcares residuales no debería preocuparnos su presencia porque en otro sentido son bastante neutras, pero es mejor eliminarlas y con una filtración a través de 2-3 micras suele ser suficiente ya que son con formas de hifas y ramificadas lo que aumenta su porcentaje de retención.

Esta especie está presente tanto sobre las uvas como en las bodegas. Es particularmente resistente al etanol (hasta un 18 % vol), al sulfuroso (hasta 50 mg/l) y al sórbico (hasta 800 mg/l) .

Se encuentra en el origen de la fermentación de medios muy ricos en azúcar. Se traduce por la formación de desórdenes y/o depósitos con modificación organolépticos (formación de ácido succínico y de ácido acético) así como riesgos de explosión de botellas. Los mostos concentrados rectificadas y los vinos licorosos son los más sensibles a este tipo de contaminación.

Presenta poder fermentativo medio y forma velo sobre vinos de baja graduación alcohólica. La acción nociva de las levaduras que forman velo es debida a su actuación sobre el alcohol y la acidez fija, oxidando al primero en tanto que la acidez fija acusa disminución en los vinos atacados y también la glicerina, lo que rebaja la cifra de la riqueza en extracto seco de estos vinos.

Una buena higiene de la bodega así como una filtración de los vinos antes del embotellado permite evitar este tipo de problemas.



Figura 3. *Zygosaccharomyces*

Brettanomyces: y su forma ascospórogena *Dekkera* es una levadura de forma alargada (forma de bolo, cabeza o barco), como vemos en el la **Figura 4**, de tamaño variable, con brotación multilateral. Las colonias observadas sobre medio sólido son de tamaño pequeño, de aspecto cremoso y brillante. Una de las características de *Brettanomyces* es su fuerte resistencia a la ciclohexamida.

Aunque muchos microorganismos del vino como *Acetobacter*, *O. oeni*, *L. hilgardii*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus* y *Saccharomyces* pueden sintetizar el 4-vinil guaiacol o el vinil fenol respectivamente a partir de los ácidos ferúlico y p-cumárico, muchos de ellos no son capaces de reducir los compuestos de vinil a 4-ertilguaiacol o a 4-etilfenol. Por este motivo, el análisis el 4-etilfenol se usa como indicador de contaminación por *Brettanomyces*.

La presencia de *Brettanomyces* en la uva formando parte de su microbiota natural es muy rara, al igual que durante la fermentación alcohólica; la crianza en barricas se revela como el foco de contaminación más generalizado, razón por la que la limpieza y desinfección de la madera con agua caliente (85-95 °C) a presión es indispensable, o en su caso la aplicación de altas presiones (80-120 bares) que permitan acelerar la limpieza sin afectar a las fibras de la madera. Una desinfección más profunda se consigue con vapor de agua a 105 °C y 0,5 bares durante 15 minutos, pero aun así es difícil erradicar la contaminación cuando es crónica y generalmente procede de barricas usadas con anterioridad, sin el oportuno control microbiológico y químico de las duelas.

Brettanomyces se caracteriza por un crecimiento lento en comparación con otras levaduras, lo que ha justificado la aparición de medios selectivos. Es raro que en los cultivos de los microorganismos a partir de las uvas, pongan en evidencia la presencia de *Brettanomyces*. No obstante, en vinificación, su desarrollo es sobre todo asociado al envejecimiento en barricas, lo que podría ser explicado por una estimulación del crecimiento por oxígeno. No es raro que esta levadura se desarrolle después del embotellado.

Brettanomyces es generalmente considerada como una levadura de alteración. En los vinos, los productos del metabolismo de *Brettanomyces* responsables de la alteración son los fenoles volátiles, las tetra-hidropiridinas (olor de ratón) y la acidez volátil. Los responsables de los defectos olfativos son sobre todo los fenoles volátiles. En efecto estos compuestos son caracterizados por olores de sudor de caballo, cuero, establo, tintes o lacas.

Una buena higiene de la bodega y el control de las fermentaciones son de seguro los dos principios de base para evitar las contaminaciones por *Brettanomyces*. Así pues, todo el material de la bodega debe mantenerse siempre limpio. Para evitar contaminaciones por *Brettanomyces*, es recomendable mantener durante el envejecimiento 30 mg/l de sulfuroso libre. Los lotes contaminados deben ser aislados y tratados (sulfuroso, filtración sobre membrana, flash-pasteurización) para suprimir con efectividad la biomasa contaminadora. Así mismo, los locales y los materiales contaminados deben ser limpiados y desinfectados antes de toda utilización.

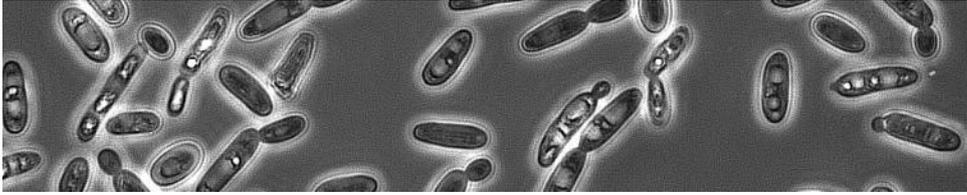


Figura 4. *Brettanomyces Bruxelensis*

Bacterias Lácticas: están presentes durante todas las etapas de la elaboración del vino. Se pueden aislar de las hojas de la viña, de la uva, del equipamiento de la bodega, de las barricas, etc.

En las primeras fases de la vinificación (mosto y principio de la fermentación) hay entre 10^3 - 10^4 ufc/ml y pertenecen a variadas especies. Las más abundantes son *L. plantarum*, *L. casei*, *L. hilgardii*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, y en menor proporción *O. Oeni* y *L. Brevis*. Su número y proporción varían en función del grado de madurez y el estado de la vendimia. Sin embargo, a medida que avanza la transformación del mosto llevada a cabo por las levaduras y se reduce la microbiota, se disminuye en su número y variedad seleccionándose sólo las más resistentes al alcohol y al bajo pH.

En condiciones normales, terminada la FA, la población de bacterias lácticas permanece estacionaria durante un periodo de unos 10-15 días, en la fase conocida como “fase de latencia”, donde la presencia de levaduras vivas y la de sustancias inhibitoras segregadas por éstas (ácidos grasos, etanol y sulfuroso), frenan el desarrollo bacteriano. Posteriormente se produce la fase de multiplicación de las bacterias hasta alcanzar una población del orden de 10^6 ufc/ml, desarrollándose entonces la FML favorecida por el pH del medio y la T. Otros factores que la favorecen son un contacto prolongado del vino con los hollejos tras la FA y la permanencia del vino con las lías ya que la autólisis de las levaduras genera nutrientes que estimulan el crecimiento de las bacterias lácticas.

La especie bacteriana que predomina al final de la FA es *O. Oeni* ya que se trata de la especie mejor adaptada al crecimiento en las condiciones difíciles impuestas por el medio (bajo pH y elevada concentración de etanol), sin embargo algunas cepas de *Pediococcus* y *Lactobacillus* también pueden sobrevivir en esta fase.

Tras la FML, las bacterias lácticas son eliminadas mediante el sulfitado desapareciendo la especie *O. Oeni* rápidamente después de la FML pero manteniéndose los *Pediococcus* y *Lactobacillus*. En caso de no sulfitar el vino y si éste es además poco ácido, puede ocurrir que algunas cepas de estas especies degraden otros componentes del vino como el ácido cítrico, ácido tartárico, glicerina, etc., dando lugar a posibles alteraciones del mismo. Los niveles de sulfuroso libre necesarios para frenar la actividad de las bacterias lácticas oscilan entre los 10-20 mg/l para vinos de pH bajos y entre 20-40 mg/l si se trata de vinos de elevado pH. Por otro lado, los cocos (*Pediococcus*, *Oenococcus* y *Leuconostoc*) son menos resistentes a la acción del sulfuroso que los bacilos (*Lactobacillus*).

1. Lactobacillus: las especies de *Lactobacillus* aisladas de la uva y de los vinos incluyen *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. hilgardii*, *L. jensenii*, *L. kunkeei*, *L. leichmanni*, *L. nagelii*, *L. plantarum*, *L. trichodes*.

A pesar de que *Lactobacillus* (**Figura5**) puede provocar la fermentación secundaria en los vinos, la FML, muchas especies son consideradas dañinas. Por ejemplo, algunos lactobacilos pueden producir diacetilo o acetoína, o tetrahidropiridinas sustituidas, compuestos que pueden aportar características indeseadas a los vinos. El crecimiento de bacterias lácticas en vinos embotellados puede llevar a enturbiamientos, sedimentos formación de gas, olores desagradables, acidez volátil excesiva y/o ácido láctico. A pesar de que los lactobacilos no pueden crecer en concentraciones de etanol > 15 % vol o a pH inferiores a 3,5; se han aislado ciertas especies de este género en vinos de licor que contenían un 20 % de alcohol.

Un serio problema que se presenta esporádicamente son las paradas o retrasos de las fermentaciones. En estos vinos tiene lugar una interrupción prematura del crecimiento de las levaduras y de la fermentación alcohólica, que da lugar a vinos con azúcares no fermentados y con concentraciones de etanol inferiores a las deseadas. Desde un punto de vista comercial, este tipo de vinos son un problema, no sólo por su gusto dulce y por su escasa calidad, sino también porque son muy delicados desde el punto de vista microbiológico.

Recientemente algunos enólogos han observado rápidas alteraciones del vino por parte de microorganismos que doblaban en población a los lactobacillus, describiéndose esta alteración como un fenómeno muy rápido con un abundante crecimiento de bacterias durante las primeras fases de la vinificación y una parada prematura de la fermentación alcohólica, lo que pone de manifiesto la inhibición de las levaduras por un crecimiento muy elevado de la población de los lactobacilos (10^9 ufc/ml), en concreto se trata de la especie *Lactobacillus kunkeei*. En el estudio de esta interacción se indica que estos lactobacilos son capaces de producir en 2-3 días una cantidad de ácido acético suficiente como para inhibir el metabolismo de las levaduras. Se sabe que el ácido acético inhibe a las levaduras afectando tanto a su crecimiento como a su capacidad fermentativa.

Desde el punto de vista de la vinificación, es necesario señalar que el uso de sulfuroso sigue siendo el mejor método para controlar las contaminaciones debidas a *Lactobacillus*. Como otros microorganismos del vino, las bacterias lácticas presentan diversos niveles de tolerancia con respecto a este aditivo. La cantidad de sulfuroso molecular presente en el vino depende de la concentración de sulfuroso libre y del pH del mosto/vino y es esta forma molecular la que tiene actividad antimicrobiana. En general, 0,8 mg/l de sulfuroso molecular son suficientes para inhibir completamente a las bacterias lácticas.

Aunque los *Lactobacillus* no tienen competencia en la FML, el crecimiento de su población puede provocar serios inconvenientes en una bodega, desde inhibición de las levaduras hasta un aumento significativo del ácido acético.

El origen del aumento de *Lactobacillus* todavía es una materia en franco proceso de investigación, sin embargo, se han logrado establecer importantes correlaciones, entre ellas que el desarrollo de estas bacterias podría estar ligado a los años secos y calurosos, donde ha habido un nulo control de enfermedades criptogámicas y, por otro lado, se han podido desarrollar uvas con un excelente potencial alcohólico, una caída del nivel de nutrientes y un elevado pH. Las toxinas que libera la bacteria debilitan la fermentación y dan paso a levaduras que no pertenecen al género *Saccharomyces cerevisiae*, tales como *Candida*, *Kloeckera* o *Picchia*.

Aunque éstas mueren cuando el medio alcanza entre 4 y 5 % vol, desencadenan la competencia por los nutrientes y vitaminas, de esta forma se debilitan las *Saccharomyces* aumentando las posibilidades de desarrollo y dominio de los *Lactobacillus*. El problema es que al encontrarse en un medio que contiene azúcares aún no fermentados, las bacterias los consumen rápidamente y forman ácido acético, pudiendo superar ampliamente el umbral perceptivo.

Cuando hay una ralentización o tendencia a la detención de la FA, los enólogos normalmente diagnostican una falta de nutrientes y levaduras, por lo tanto la primera acción es elevar sus respectivas dosis. También se tiende a aumentar la T de fermentación, lo que favorece la proliferación de las bacterias y, en definitiva, las levaduras acaban por perder la batalla.

El aumento de *Lactobacillus* está directamente ligado a la espera de la madurez fenólica de las uvas y a la decisión de cosechar cada vez más tarde. Además se está trabajando con pH extremadamente elevados con niveles de 3,8 y 3,9 y el ácido sulfuroso en la uva es bajísimo, lo que permite el desarrollo de estos microorganismos.

Por otro lado, niveles altos de azúcar y alcohol producen un empobrecimiento general del medio y las bacterias consumen los pocos nutrientes de las levaduras.

La forma de combatir estas bacterias es mediante el empleo de lisozima que ataca exclusivamente a las bacterias Gram + de paredes celulares más simples, es pues capaz de perforar sus membranas y facilitar la entrada de solutos desencadenando una acción lítica que acaba con los *Lactobacillus*. Estas enzimas a su vez no afectan a las levaduras ni acaban con las bacterias responsables de la FML, no eliminan los *Oenococcus*, tan sólo los inhiben temporalmente.

Es muy importante tener claro que un vino con *Lactobacillus* está “enfermo” y que desgraciadamente no se puede “curar”. La bacteria puede ser inhibida bajo ciertas condiciones, pero cuando éstas cambian, puede reactivarse. Sólo las membranas de menos de 0,65 micras son capaces de eliminar estas bacterias y siempre que la presión no exceda de 1 bar, pues de lo contrario la membrana debe ser de 0,45 micras.

Medidas preventivas: dosis mínimas de 5 gr/hl durante el llenado de las cubas ya que la bacteria es muy sensible en este periodo, pH entre 3,5-3,7 para dificultar el desarrollo de la bacteria y hacer más efectivo el sulfuroso libre, higiene absoluta en toda la bodega y equipos usando para el lavado general agua caliente con un mínimo de 90 °C, empleo de lisozima en dosis de 15 grs/hl.

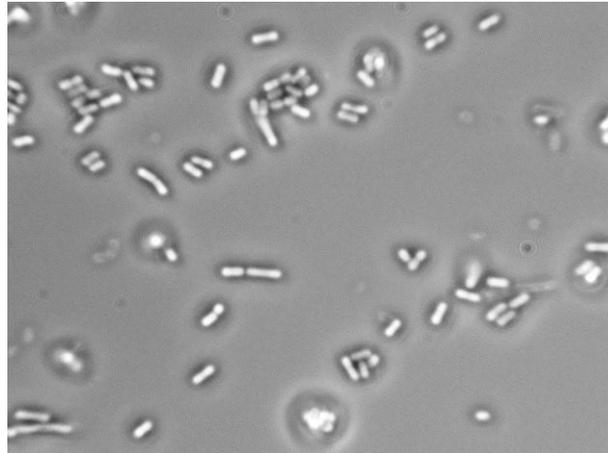


Figura 5. Imagen de *Lactobacillus*

A) *Lactobacillus casei*: bacteria láctica Gram +, heterofermentativa facultativa y con forma de bacilo muy cortito. Son buenos y no suelen dar muchos problemas.

B) *Lactobacillus brevis*: bacteria láctica Gram +, microaerófila, heterofermentativa, de forma bacilar. Sola o en cadenitas cortas. Las colonias sobre medio sólido suelen ser pequeñas, lisas, brillantes y de color blanco opaco.

Presencia débil sobre las uvas (10^2 - 10^4 ufc/ml) y generalmente más baja a final de la fermentación alcohólica y maloláctica. Su crecimiento en el vino depende mucho del pH del medio y tras la FML, un pH elevado puede conducir al desarrollo de poblaciones altas ($> 10^6$ ufc/ml).

Si se desarrollan, estas bacterias son las responsables de la “enfermedad de la turné” que es la degradación del ácido tartárico con producción de CO₂, de ácido succínico y de ácido acético. Los vinos se vuelven gaseosos, turbios y flacos.

En caso de fermentaciones lentas o paradas en vinos poco ácidos y sobre todo poco sulfitados, la presencia de hexosas no fermentadas puede conducir a que esta bacteria se multiplique dando lugar al picado láctico (producción de ácido acético y ácido D-láctico a partir de glucosa) y a la formación de manitol (a partir de fructosa). Este riesgo ya observado en botellas de vino con niveles altos de alcohol (como vinos licorosos o mistelas) da vinos gaseosos, turbios con mucho ácido acético. El manitol producido no provoca problemas particulares pero es también acompañado con concentraciones altas de n-propanol, 2-butanol y diacetilo (lo que incrementa mucho el aroma de mantequilla en los vinos). Los vinos son además con frecuencia ligeros.

Esta bacteria también es responsable del “olor de ratón” por la formación de una amina particular constituida por dos isómeros de 2-acetyltetrahydropyridina.

Aunque la capacidad de degradar el glicerol está poco representada en las bacterias lácticas, cepas de *Lactobacillus brevis* son capaces de metabolizarlo y producir acroleína lo que al combinarse con los antocianos de los vinos tintos da un carácter de amargor muy pronunciado.

En cuanto a las acciones preventivas, en vinos poco ácidos (especialmente algunos vinos tras la fermentación maloláctica), mantener niveles de sulfuroso libre suficientes (25 mg/l). La eliminación de estas bacterias de contaminación está realizada con la adición de sulfuroso o de lisozima.

C) *Lactobacillus kunkeei*: bacteria láctica heterofermentativa, Gram +. Todo indica que la tendencia a cosechar cada vez más tarde incide en el auge de la población de estas bacterias lácticas. Ha sido bautizada en EEUU como la “bacteria feroz” y es uno de los responsables de la ralentización o paralización de la fermentación alcohólica y el aumento del ácido acético en los vinos. Una peligrosa amenaza que sólo admite dos alternativas posibles, prevenir o lamentar.

En la uva cosechada, el daño de los orujos por pájaros e insectos (asociados a gran madurez) contribuiría en los niveles de bacterias productoras de ácido acético como las *Lactobacillus kunkeei*. Niveles normales de sulfuroso de 30 a 50 mg/l no son suficientes para suprimir esta actividad.

D) *Lactobacillus plantarum*: bacteria láctica, Gram +, tiene forma de bacilo normalmente formando parejas y cuyo pleomorfismo es en forma de bastón muy alargado.

Aunque la FML en vinos es llevada a cabo generalmente por *Oenococcus oeni*, otras bacterias lácticas, en concreto algunas especies de los géneros *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. brevis*, *L. hilgardii*,...) y *Pediococcus*, pueden ser responsables de la transformación del ácido málico en el vino por actuación del enzima maloláctico que se presenta en todas las especies de bacterias lácticas aisladas de vinos pero que se aisló por primera vez en *Lactobacillus plantarum*.

Por otro lado, aunque la capacidad de degradar el ácido tartárico no está muy extendida entre las bacterias lácticas, el catabolismo de este ácido siempre es perjudicial para el vino porque hace disminuir la acidez fija y aumentar la acidez volátil. Esta degradación del ácido tartárico por bacterias lácticas se conoce como "vuelta o rebote" y de 78 cepas estudiadas sólo cuatro, pertenecientes a las especies *L. plantarum* y una de *L. brevis* fueron capaces de degradar este ácido. El pH es un factor limitante de esta alteración y solamente hay ataques bacterianos al ácido tartárico a pH superior a 3,65, estos microorganismos a su vez se muestran muy sensibles al alcohol y al sulfuroso libre.

Los vinos atacados, tintos o blancos, presentan enturbiamiento, cambio de color, aspecto achocolatado, negruzco en tintos y oscurecimiento en los blancos; en la superficie aparecen burbujas de gas, como si fermentara lentamente. A veces el desprendimiento de gas es enérgico, haciendo saltar el tapón del envase (rebote).

Cuando la enfermedad está avanzada, se aprecian en la superficie irisaciones coloreadas como si fueran islotes flotantes de grasa. El vino se enturbia y forma abundante precipitado. El olor y sabor se alteran profundamente, llegando a ser repugnantes por la formación de compuestos derivados de la tetrahidropiridina.

También se ha descrito que entre las bacterias lácticas aisladas de vinos, sólo las bacterias de la especie *L. plantarum* poseen actividad tanasa.

La enzima tanasa es una hidrolasa que actúa sobre los taninos presentes en el vino por lo que representa una actividad muy importante en enología por su relación con el color y con fenómenos de enturbiamiento.

2. *Pediococcus*: bacteria láctica aerobia-microaerófila, homofermentativa, catalasa negativa, Gram +, no móvil y de forma redonda (coco). (**Figura 6**) Raramente sola, nunca en cadenas pero presente en pares o tetradas ya que se divide en dos planos pudiéndose llegar a observar al microscopio grandes grupos de células.

Los pediococos se encuentran generalmente en los vinos tintos durante la crianza en barrica. Además de por el pH, el crecimiento de *Pediococcus* en el vino está influido por un conjunto de condiciones como el sulfuroso, el etanol y la lisozima, aunque a esta última son más resistentes que otras bacterias lácticas como *Lactobacillus* o *Oenococcus*.

Su presencia en el vino produce olores desagradables y sabores que pueden ser descritos como “amargo”, “excesiva mantequilla”, o incluso “calcetines sucios”. Son capaces de producir también el diacetilo, un compuesto que recuerda a la “mantequilla” y que a elevadas concentraciones se convierte en negativo. Algunas especies son capaces también de degradar el glicerol hasta acroleína, un compuesto que reacciona con los fenoles provocando una sensación más amarga.

Además de estos olores desagradables, estas bacterias están implicadas también en la producción de polisacáridos extracelulares a partir de la glucosa. Estos polímeros provocan un aumento de la viscosidad del vino. Se cree que los pediococos asociadas a tal efecto tienen una mayor tolerancia al etanol con respecto a otras cepas, siendo *P. damnosus* el principal responsable de la producción de polisacáridos en el vino.

Presencia débil sobre las uvas (10^2 - 10^4 ufc/ml) y generalmente más baja al final de la fermentación alcohólica y maloláctica. Su crecimiento en el vino depende mucho del pH del medio. Puede ser responsable de la FML del vino aunque lo es generalmente *Oenococcus oeni*. Sin embargo, tras la FML, un pH elevado combinado a una eficacia limitada del sulfuroso, puede conducir al desarrollo de poblaciones importantes (10^5 - 10^6 ufc/ml).

No todas las cepas de *Pediococcus* tienen las mismas características, pero entre ellas encontramos cepas responsables de la “enfermedad de la grasa” o de los vinos “ahilados” que altera la filtrabilidad de los vinos contaminados debida a la producción de un polisacárido exocelular (glucano). En presencia de estas cepas, la producción de glucanos puede ser muy lenta y producirse en botella.

Otras cepas además pueden metabolizar el glicerol y producir acroleína que al combinarse con los antocianos de los vinos tintos da una característica de amargor muy fuerte.

También podemos encontrar concentraciones altas en diacetilo en vinos poco ácidos donde la FML es realizada con cepas de *Pediococcus*.

Tras el final de la FML, se deben eliminar las bacterias con un sulfitado (con adición de lisozima) durante un trasiego porque los riesgos de desarrollo de *Pediococcus* se incrementan mucho con la disminución de la acidez que tiene lugar durante la FML.

En caso de detección de *Pediococcus* pero sin un incremento visible de la viscosidad del vino, hacer una filtración estéril o sulfitar el vino. En caso de aparición de la “enfermedad de la grasa”, tratar el vino mecánicamente tras un sulfitado y después hacer una filtración fina para encontrar una viscosidad normal. Para evitar la contaminación de otros vinos, es necesario eliminar totalmente este microorganismo con una desinfección muy estricta de la bodega.

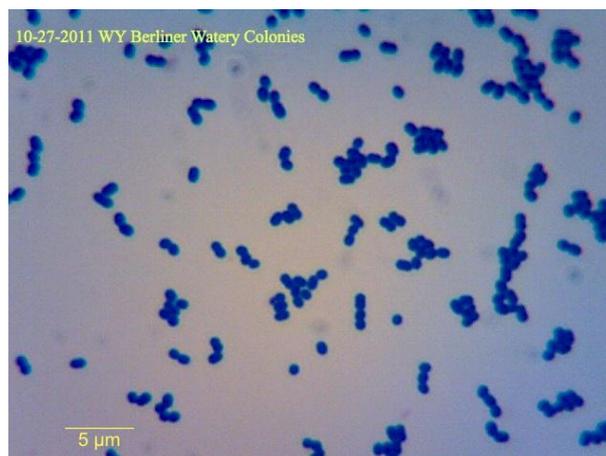


Figura 6. *Pediococcus*

3. *Oenococcus oeni*: bacteria láctica, microaerófila, heterofermentativa, Gram +, de forma redonda y generalmente presenta en pares o en cadenas. (**Figura 7**).

El crecimiento es lento incluso en condiciones óptimas. Las colonias sobre medio sólido son de color blanco gris y de pequeño tamaño.

Bacteria con presencia débil sobre las uvas (10^2 - 10^4 ufc/ml) y generalmente limitada durante la fermentación alcohólica (excepto si hay un picado láctico). Se multiplica después para alcanzar el nivel de arranque de la fermentación maloláctica (población de 10^6 ufc/ml), lo que le permite ser responsable de la mayoría de las fermentaciones malolácticas de los vinos. Es pues la especie más adaptada a las condiciones limitadas del vino (etanol, acidez, temperatura). Son generalmente las cepas de esta especie las que son seleccionadas para la producción de bacterias malolácticas. Sin embargo, su crecimiento en el vino depende mucho de las condiciones del medio, especialmente del pH.

Cuando hay fermentaciones lentas o paradas, la multiplicación de esta bacteria en presencia de hexosas no fermentadas puede conducir al picado láctico y a la formación de manitol.

Hay cepas indígenas de *O. Oeni* que tienen enzimas capaces de aumentar la concentración de compuestos no higiénicos en vinos: aminos biógenos a partir de aminoácidos y carbamato de etilo a partir de arginina.

Las cepas de *O. Oeni* no son responsables de la “enfermedad del amargor” porque muy pocas cepas tienen la posibilidad de metabolizar el glicerol para formar acroleína. Por el contrario, esta bacteria es capaz de reducir el ácido sórbico añadido en el vino en sorbitol (trans-hexa-2,4-dienol) y conducir a la producción del “olor de geranio”.

Cuando las uvas tienen una maduración muy alta, el contenido en azúcares reductores y los pH elevados son favorables a paradas de fermentación alcohólica, pero también al crecimiento de las bacterias lácticas.

El riesgo de picado láctico no puede estar excluido. Frente a este problema se deben eliminar las poblaciones de bacterias indígenas presentes (filtración, lisozima), antes de hacer una reinoculación con levaduras para terminar la fermentación de los azúcares residuales.

Si en la flora indígena existen cepas que producen histamina, tiramina o carbamato de etilo, éstas se deben eliminar y emplear cepas de bacterias seleccionadas para la FML.

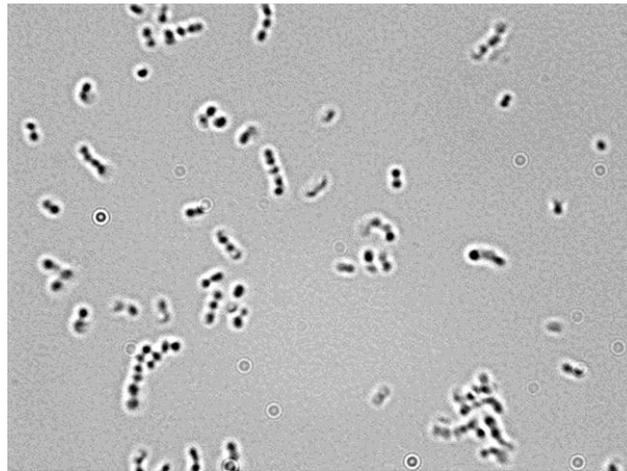


Figura 7. *Oenococcus Oeni*

Acetobacter aceti: bacteria acética Gram -, de forma elipsoidal o alargada que se presenta sola y/o en pares o cadenas. (**Figura 8**). Las colonias sobre medio sólido son de color pálido, localizadas en la superficie y de pequeño tamaño.

Presente en el vino, la bodega y las uvas, siendo de poca población sobre las uvas sanas pero elevada sobre las uvas que presentan podredumbre ácida ($> 10^6$ ufc/ml). Su presencia en el vino con poblaciones residuales ronda las 10^2 - 10^3 ufc/ml, ya que al contrario de los que se dice, estas bacterias pueden sobrevivir en condiciones de semianaerobiosis o de anaerobiosis que prevalecen durante la fermentación alcohólica. Sus fuentes de carbono son etanol, azúcares, ácido láctico. Además “superoxida” etanol y ácido acético para transformarlo en CO_2 y H_2O .

Responsable del picado acético y de la aquiescencia de los vinos (acetato de etilo).

Son posibles alteraciones en cubas o en barricas durante la crianza del vino incluso con bajas concentraciones celulares debido a los trasiegos. *Acetobacter aceti* produce también etanal a partir de etanol, dihidroxiacetona a partir de glicerina y el ácido glucónico a partir de hexosas. También puede oxidar el ácido láctico a acetoína en condiciones pobres de oxígeno.

Además de modificar las cualidades sensoriales de los vinos, tanto la acetoína como la dihidroxiacetona pueden unirse al SO₂ y disminuir de este modo su eficacia.

Es necesario impedir su proliferación durante la conservación del vino con prácticas como rellenos frecuentes, obturación hermética de los tapones, utilización de gases inertes, y dosis de sulfuroso adaptadas al pH del medio. También hay que estar muy atentos a los trasiegos durante el verano porque la subida de temperatura en las bodegas puede permitir su multiplicación en el vino.

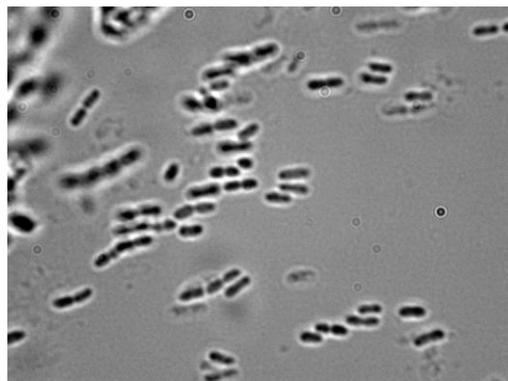


Figura 8. *Báctérias Acéticas*

POBLACIÓN MICROBIANA

En diferentes etapas de la elaboración del vino y antes de su acondicionamiento, es importante conocer el nivel de la población de levaduras y bacterias. Por ejemplo, durante la vinificación de un vino tinto, cuando la FML tarda en ponerse en marcha. El sulfitado que se realiza al final de la FML no los elimina a todos. Pero es sobre todo durante la crianza cuando el control microbiológico es útil.

Por ejemplo en el transcurso de los trasiegos ya que tanto en depósito como en barrica, el vino siempre aloja microorganismos y entonces las contaminaciones son posibles, antes del embotellado, para asegurarse que el vino está definitivamente estabilizado. El resultado permite decidir el tipo de tratamiento eventual necesario aparte del sulfitado, de la filtración o del tratamiento mediante calor. Los métodos de recuento deben de ser rápidos, sensibles y fiables. (*Zamora 2003*).

Por microscopia, se pueden contar levaduras o bacterias empleando una placa de Neubauer o de Thoma. Empleando también la epifluorescencia mediante la coloración con reactivos fluorescentes que permite contar fácilmente las levaduras y las bacterias viables. La fluorescencia de las células está relacionada con su actividad metabólica, luego también con su vitalidad.

Pero lo más tradicional para contar los microorganismos vivos, es recurrir al recuento de colonias desarrolladas sobre medio nutritivo sólido. Si tenemos una célula viva procedente de una muestra de vino, la sembramos sobre un medio específico y selectivo mediante la adición de antibióticos, la incubamos a una temperatura y la sometemos a una atmósfera adecuada, se va a multiplicar. El crecimiento de la población se da en el lugar donde se ha depositado la célula. Las células de levaduras o bacterias se acumulan en este punto de modo que tras un cierto número de generaciones se forma una colonia visible a simple vista. Es por esta razón que el resultado de los recuentos por conteo de colonias se expresa en UFC (Unidad Formadora de Colonias) por unidad de volumen.

El método permite contar selectivamente las levaduras totales, las bacterias lácticas y las bacterias acéticas. Desde el mosto en plena fermentación hasta el vino pobre en microorganismos, se puede determinar cualquier nivel de población. El tiempo de incubación necesario para el desarrollo de las colonias es de 2-3 días para las levaduras totales, 3-4 días para las bacterias acéticas, 5-7 días para las levaduras no-Saccharomyces y 10 a 12 días para las bacterias lácticas. La ventaja de este método es su sensibilidad y su especificidad; tiene el inconveniente de necesitar una espera importante para el resultado.

No obstante, una parte de la microflora escapa al conteo, ya que todas las células vivas en el vino no están adaptadas al crecimiento en el medio de cultivo utilizado en el laboratorio. La diferencia entre el contar por epifluorescencia y el recuento de colonias sobre medio sólido se interpreta por la existencia de una microflora viable no cultivable (VNC).

Por su parte, el estado “viable no cultivable” (VNC) consiste en que aunque las células no puedan crecer en medios de cultivo rutinarios en los cuales crecerían y se convertirían normalmente en colonias, están vivas y tienen una actividad metabólica renovada (*Millet y Lonvaud-Funel, 2000*).

Son diversos los microorganismos que crecen en condiciones naturales y que aún no han podido ser cultivados en el laboratorio. Especies pueden existir en un estado en el que son viables pero no pueden ser cultivadas por los métodos microbiológicos tradicionales. Esta diferenciación de las células a un estado viable pero no cultivable (VNC) representa una estrategia de supervivencia para muchas especies de microorganismos. El estado VNC es morfológicamente distinto a la célula normal. Se ha observado que el estado VNC se induce principalmente por la falta de nutriente, así como por cambios en la concentración salina o por variaciones en la temperatura. El concepto de “viables no cultivables” fue introducido por el grupo Byrd and Colwell's en los años 80. De acuerdo a *Oliver (1993)* una bacteria en el estado de VNC se define como “célula que es metabólicamente activa, mientras que es incapaz de experimentar la división celular requerida para el crecimiento en un medio de cultivo”. En el estado VNC las bacterias realizan un mínimo de las condiciones metabólicas, sin embargo pueden ser resucitadas o reanimadas y pasar a un estado normal. Los microorganismos que presentan un estado viable no cultivable exhiben a menudo una disminución del tamaño. Durante este periodo suelen ocurrir un número de cambios metabólicos importantes, incluyendo reducciones en el transporte de nutriente, disminuye la tasa de respiración, y la síntesis de macromoléculas. También se han encontrado cambios en cuanto a la composición de los ácidos de la membrana citoplasmática, que son esenciales de las bacterias en este estado. La virulencia de algunas bacterias también se ve disminuida.

Se presentan cambios importantes en los lípidos celulares y en la síntesis de proteínas. Los niveles del ATP, que declinan rápidamente en células muertas y moribundas, en las células VNC mantienen los valores altos. Son diversos los factores que pueden conllevar a que las células se incorporen al estado de VNC, este estado es una respuesta a ciertas tensiones naturales, o stress tal como falta de nutrientes, cambios en la temperatura optima del crecimiento, concentraciones osmóticas elevadas, concentración de oxígeno, o exposición a luz blanca...

Éstas son típicamente las tensiones ambientales que pudiesen ser mortales si las células no incorporaran a este estado de inactividad. Además, un número de estudios ha reflejado que los procesos que se asumen normalmente como bactericidas para las bacterias, pueden en algún momento dar lugar a que las células pasen al estado de VNC. Estos procesos incluyen los tratamientos como la pasteurización y de la desinfección con cloro. Los patógenos de origen alimentario en medios nutricionalmente ricos alcanzan el estado VNC cuando alcanzan temperaturas de refrigeración. Las bacterias que permanecen en estado VNC pueden tardar varios días para su recuperación o resucitación, así que es necesario proveerle de un alto contenido de nutrientes para favorecer su cultivabilidad. Son microorganismos que pueden permanecer en el ambiente largos periodos pero no son cultivables, aún siendo capaces de producir enfermedad. La metodología que se ha seguido para llevar adelante el estudio de los microorganismos en el estado VNC, tanto en muestras ambientales, de alimentos y clínicas, han implicado la utilización de técnicas de biología molecular y microscopia electrónica, tales como PCR, FISH, DGGE, EXPRESIÓN GÉNICA, CITOMETRIA DE FLUJO y MICROSCOPIA CONFOCAL, entre otras.

IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS DEL VINO

La capacidad de las levaduras y bacterias de vino de transformar compuestos del medio depende no solamente del nivel total de su población, sino también de la naturaleza de los géneros, las especies y las cepas presentes. Para que las reacciones que efectúan, influyan en la calidad del vino, las variaciones de concentración de las diversas moléculas formadas deben sobrepasar el umbral de sensibilidad.

Por eso es importante conocer la especificidad de las cepas presentes. Y de ahí su interés por su identificación.

Los métodos a emplear se adaptan en función de las necesidades. Los análisis convencionales se basan en la observación de caracteres fenotípicos de orden morfológico, fisiológico o metabólico. Los métodos moleculares más recientes utilizan directamente el genoma del microorganismo y determinan todos sus caracteres fenotípicos. En resumen, los métodos convencionales identifican los microorganismos a través de la expresión del genoma, mientras los moleculares apuntan directamente el ADN. Estos últimos son los más precisos y fiables.

Los métodos convencionales:

Se identifican los microorganismos tras haber sido aislados por cultivo sobre medio de agar nutritivo. A partir de una muestra de vino, es fácil separar las levaduras de las bacterias por adición en el medio de pimarcina para eliminar las levaduras, o de cloranfenicol para eliminar las bacterias. Para distinguir entre levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* es necesario adicionar cicloheximida (actidiona) que tiene por efecto impedir el crecimiento de *Saccharomyces*. Por último, para separar las bacterias lácticas de las bacterias acéticas, se añade penicilina al medio. El antibiótico permite solamente el desarrollo de las bacterias acéticas. La incubación para las bacterias lácticas se hace en aerobiosis. Sobre cápsulas de Petri incubadas en atmósfera de CO₂. Después se pueden tomar estérilmente las colonias, y ponerlas en cultivo líquido para poder tener más población y realizar más pruebas precisas.

- Las levaduras: La observación microscópica permite examinar la forma y el tamaño de las células, la formación de esporas, el modo de reproducción de las levaduras. Cierta número de especies puede ser fácilmente reconocido por la simple observación microscópica de las células en crecimiento. Las levaduras *Kloeckera apiculata* y *Saccharomyces ludwigii* se reconocen con facilidad por su forma de limón, denominada levadura apiculada, siendo la primera aproximadamente diez veces más pequeña que la segunda. *Candida stellata* se caracteriza por una gemación con forma de estrella específica.

Contrariamente a la mayoría de las levaduras del vino que se multiplican por gemación, *Schizosaccharomyces pombe* se diferencia del resto de especies utilizando la escisiparidad para su multiplicación vegetativa.

Las pruebas fisiológicas de fermentación o de asimilación de diferentes sustratos y de resistencia a los antibióticos completan la identificación de las levaduras por observación microscópica. Durante mucho tiempo, se han utilizado estas pruebas para distinguir las variedades, en el seno de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. No obstante, los caracteres fisiológicos son extremadamente variables de una cepa a otra dentro de una misma especie. Por otro lado, emplear sólo los caracteres fisiológicos para clasificar las especies plantea el problema de la estabilidad del fenotipo de una cepa dada durante la conservación. Numerosos estudios han mostrado que los perfiles de fermentación pueden variar tras un largo periodo, sobre todo cuando el fenotipo observado depende de un sólo gen mutable.

La delimitación interespecífica de las levaduras del vino se basa, desde ahora, en el significado biológico y genético de la noción de especie. Empleando el criterio de base para la delimitación de las especies, se puede identificar las dos principales especies que intervienen en la transformación de la uva en vino: *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces uvarum*. Las esporas de la cepa a identificar, obtenidas por vía sexual, se cruzan con las esporas de una cepa de referencia de las especies *S. cerevisiae* y *S. uvarum*. Cuando el cruce da una línea fértil, las dos esporas pertenecen a la misma especie. En caso de esterilidad, las esporas proceden de cepas pertenecientes a especies diferentes. Esta técnica, relativamente sencilla, sigue siendo lenta a poner en marcha para la identificación de un gran número de aislados.

- Las bacterias: La observación microscópica es indispensable. La forma de las células, redondeadas o en bastón, su disposición en cadenas o en tetradas, da una idea del resultado. Si la observación se efectúa después de la tinción según el método de Gram, se distinguen además las bacterias lácticas (Gram + violeta) de las bacterias acéticas (Gram - rosa).

Por último, la cepa es identificada, como coco o lactobacilo por su forma, su carácter homofermentativo o no, y por el espectro de uso de los azúcares y derivados. Para las Bacterias Lácticas los aislados se clasifican entre los géneros *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus* o *Lactobacillus* y varias especies, de las cuales las principales en el vino son:

Lista de las especies de bacterias lácticas más corrientes en el mosto de uva y el vino:

- *Bacilo*: *Lactobacillus plantarum*, *L. casei* (homofermentativo); *Lactobacillus hilgardii*, *L. brevis* (heterofermentativo).
- *Coco*: *Pediococcus damnosus*, *P. parvulus* (homofermentativo); *Leuconostoc mesenteroides*; *Oenococcus oeni* (heterofermentativo).

Las bacterias acéticas se distinguen bastante fácilmente de las bacterias lácticas en las observaciones microscópicas en estado fresco, ya que la mayoría son muy móviles. Pero la tinción de Gram es mucho más fiable. En el mosto de uva y el vino, sólo predominan tres especies: *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter aceti*. Su identificación se basa en su capacidad de oxidar el etanol, el glicerol y el ácido láctico. La primera especie sólo oxida el etanol, las dos restantes oxidan, respectivamente, el etanol y el lactato (*A pasteurianus*) o los tres sustratos (*A aceti*).

Identificación por métodos moleculares:

El principio de base es identificar las levaduras o las bacterias refiriéndose a su contenido genético, total o parcial. El método recurre a las similitudes de los genomas que definen el grado de parentesco entre las cepas. Así, los genomas de dos cepas de *Oenococcus oeni* presentan mayor similitud entre ellos que el de un *Oenococcus oeni* y de un *Lactobacillus plantarum*, por ejemplo. Es a nivel de la secuencia del genoma que se establecen las comparaciones. Por supuesto, no se trata de analizar la secuencia de los genomas completos. Los métodos analíticos que se basan sobre las diferencias, o similitudes, de las secuencias, permiten las comparaciones. Éstos utilizan cuatro importantes propiedades de la molécula de ADN.

El material genético, representado por los cromosomas y los plásmidos, está constituido de ADN, un polímero de nucleótidos caracterizados cada uno por una molécula básica adenina (A), citosina (C), timina (T), guanina (G). La molécula de ADN está compuesta por dos «hebras» paralelas de polinucleótidos unidos entre ellos a nivel de las bases mediante uniones hidrógeno débiles: A está unido a T, y G a C.

Se denomina secuencia la sucesión de bases sobre la hebra de ADN. Las dos hebras son llamadas «complementarias» debido al apareamiento de las bases que siempre es respetado: a la secuencia ATGC de una hebra corresponde la secuencia TACG de la hebra opuesta. Se emplean cuatro propiedades de la molécula de ADN para la identificación:

. La *capacidad de ser «desnaturalizada»*: Las dos hebras paralelas se separan fácilmente por calor: es la desnaturalización. El retorno a la temperatura ambiente permite el reapareamiento de ambas cadenas.

. Las enzimas, llamadas *enzimas de restricción*, hidrolizan la cadena nucleotídica en sitios bien específicos para cada una de ellas; la especificidad viene dada por la secuencia a nivel del sitio de corte.

. El ADN puede ser sintetizado in vitro a partir de nucleótidos, por una polimerasa que los junta siguiendo la secuencia complementaria de un ADN llamado matriz. La «*Taq polimerasa*», enzima termoresistente. Por otra parte, la polimerasa sólo puede funcionar a partir de cebos. Éstos son secuencias cortas de ADN escogidas. Debido a su secuencia, éstas hibridan al ADN y delimitan la región del genoma que es copiada varios millones de veces. La acumulación de copias hace fácil la visualización de esta región tras electroforesis.

. Las *moléculas de ADN están cargadas negativamente* en un tampón de electroforesis. En función de su tamaño, migran más o menos hacia el cátodo bajo la acción del campo eléctrico. El ADN es señalado en los geles por tinción al bromuro de etidio e iluminación bajo UV.

- Identificación de las levaduras: Las primeras tentativas para diferenciar las cepas de *S. cerevisiae* concernían el estudio de las macromoléculas exocelulares en electroforesis. Pero esta técnica, basada como muchas otras en un simple criterio bioquímico de diferenciación, resulta ser poco discriminante y difícilmente permite la caracterización de las cepas de *S. cerevisiae*. Además, depende de numerosos parámetros (estado fisiológico de cada célula, condiciones de cultivo, etc.) y obliga a trabajar en condiciones estrictamente controladas y estandarizadas.

Las recientes técnicas de la biología molecular, que permiten el análisis directo de la estructura fina del genoma de la levadura, son excelentes herramientas para la caracterización de las especies y de las cepas de *S. cerevisiae* y de *S. uvarum*. Los métodos desarrollados para la identificación de las levaduras se basan en el análisis del ADN nuclear o mitocondrial. A menudo, se utiliza el mismo principio para la caracterización de las levaduras a nivel de la especie y de la cepa. Las primeras técnicas de la biología molecular puestas en marcha para la identificación de las levaduras enológicas conciernen el ADN mitocondrial, material elegido por su polimorfismo estructural de una cepa a otra y su estabilidad durante la multiplicación vegetativa. El método consiste en extraer el ADN mitocondrial y aislarlo del ADN nuclear. Una vez cortados por medio de las enzimas de restricción, se separan los fragmentos obtenidos sobre un gel de electroforesis. Este método lleva el nombre de RFLP, Polimorfismo de Tamaño de los Fragmentos de Restricción. El número y el tamaño de los fragmentos de restricción varían de una especie a otra, pero igualmente de una cepa a otra. Esto ha permitido poner de manifiesto la gran diversidad genética que existe entre las distintas cepas enológicas de *S. cerevisiae*. Paralelamente, se ha desarrollado el uso de la electroforesis en campo pulsado: los cromosomas de *S. cerevisiae* o de *S. uvarum* son moléculas de ADN de tamaño muy grande (200 a 2000 kb), que no pueden ser separados por métodos de electroforesis clásica. La electroforesis a campo pulsado consiste en aplicar un campo eléctrico alternativo, mediante un juego de electrodos colocados a 120° y cuya orientación cambia en el momento de los « pulsos » (aplicación de la corriente eléctrica) de

tiempo definido. Las moléculas de ADN sufren un fenómeno de reorientación debido a la posición de los electrodos, las moléculas de tamaño pequeño se reordenan más fácilmente que las de gran tamaño. Resultado de la migración, se obtiene un cariotipo. La diferenciación de las cepas según esta técnica se basa en el poliformismo de tamaño de los cromosomas de la levadura. Aplicada a la enología, la electroforesis en campo pulsado permite la identificación de las especies *S. cerevisiae* y *S. uvarum*. En particular, se trata de una herramienta muy discriminante para caracterizar las cepas de *S. cerevisiae* y *S. uvarum* en los estudios enológicos.

Su puesta en práctica sigue siendo relativamente lenta (preparación del ADN y migración), y necesita de un material específico caro y de tiempos de migración de 24 a 48 h para separar correctamente los cromosomas.

La caracterización de las levaduras del vino ha recurrido cada vez más a la Reacción de Polimerización en Cadena (PCR). Este método consiste en amplificar vía enzimática in vitro las regiones del genoma de las levaduras que difieren de una cepa a otra (frecuencias de aparición en el genoma, naturaleza de las secuencias). La reacción puede hacerse directamente sobre las células enteras aisladas o en suspensión en el vino. Tras amplificación, los fragmentos obtenidos son directamente separados sobre gel de agarosa o cortados por enzimas de restricción antes de ser analizados por electroforesis. Las secuencias apuntadas para la amplificación se localizan a menudo a nivel de los ADN ribosómicos, región muy usada para los estudios filogenéticos. Estos métodos son sencillos y rápidos de poner en marcha. Se emplean normalmente para los controles de calidad de lotes de producción industrial de Levaduras Secas Activas, pero también para los controles de implantación de las preparaciones de levaduras en vinificación. La PCR se utiliza asimismo para la detección y la identificación genética de las levaduras de alteración, como las *Brettanomyces* o las *Zygosacharomyces bailii*.

- Identificación de las bacterias

Identificación a nivel de la especie:

El primer método molecular usado para las bacterias del vino se basaba en la hibridación ADN/ADN. El ADN de las cepas a identificar es depositado y fijado bajo forma de filamento simple desnaturalizado sobre una membrana de nylon.

Por otro lado, disponemos de ADN específico extraído de una cepa de referencia, marcado radioactivamente o por derivados químicos de nucleótidos. Es la sonda de ADN, que puede ser específica de una especie. El ADN total extraído de *Oenococcus Oeni*, luego marcado y desnaturalizado bajo forma de filamento simple, constituye una sonda que solamente se hibrida con depósitos de ADN de cepa de *Oenococcus Oeni*. Varias especies de bacterias del vino pueden ser identificadas de este modo. La identificación a nivel de la especie también puede efectuarse por PCR. los cebadores deben ser específicos, es decir que sólo se hibridan con el ADN de la especie en cuestión.

En estas condiciones, la PCR se traduce por la amplificación, o sea la acumulación en el medio de un fragmento de ADN que únicamente existe en esta especie. Por otro lado, se puede identificar cualquier bacteria por amplificación del ADN ribosómico.

Para ello, disponemos de cebos «universales» que se hibridan a regiones muy conservadas del ADN ribosómico de todos los procariotas. Como la región amplificada entre los cebadores es variable según las bacterias, la secuenciación del amplificado permite la identificación refiriéndose a los bancos de genes ribosómicos. Es el método utilizado cuando se pretende identificar y cuantificar.

Identificación a nivel de la cepa:

El cromosoma bacteriano es hidrolizado por enzimas de restricción cuyo número de sitios de corte es estadísticamente débil. La rareza del sitio depende de la longitud del sitio de la secuencia reconocida. El genoma total de un lactobacilo o de un coco es cortado en 10-15 fragmentos fácilmente separables por electroforesis en campo pulsado. El perfil de hidrólisis del ADN de dos cepas de bacterias de una misma especie es diferente. De este modo, podemos por ejemplo darnos cuenta de la diversidad de las cepas de *Oenococcus Oeni* durante una FML.

1.2 OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

En este trabajo el objetivo es explicar detenidamente la técnica de epifluorescencia para la determinación y cuantificación de microorganismos en el vino tinto y su comparación con otras técnicas utilizadas. Así como la experimentación de las distintas técnicas utilizadas en el laboratorio.

1.3 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Se van a realizar los estudios basándonos en los experimentos que se muestran a continuación. En los cuáles usan la epifluorescencia para determinar distintas células.

Microbiological control of wine. The application of epifluorescence microscopy method as a rapid technique

Autores: C. Kopke, A. Cristovao, A. M. Prata, C. Silva Pereira, J. J. Figueiredo Marques; M.V. San Romao.

Fuente: Food Microbiology, 2000, 17, 257-260.

Resumen:

En este estudio, se utilizó la microscopía de epifluorescencia (tinción vital) para el control microbiológico de vinos, los resultados se compararon con los recuentos de placas de unidades formadoras de colonias (ufc). Se utilizaron como fluorocromos 4',6-diamino-2-fenil-lindole (DAPI) en combinación con Yoduro de Propidio (PI). La correlación entre los dos métodos (recuentos de placas y tinción vital) fue de 0,52 y 0,83 para el control de los vinos terminados y no terminados, respectivamente. De acuerdo con los resultados obtenidos de la tinción vital con DAPI combinado con PI, vemos se trata de un control rápido para el vino durante el proceso tecnológico, y que puede ser utilizado por las productoras industriales de vino como un indicador de la calidad microbiológica del vino, con ahorro en tiempo y dinero.

Para los vinos terminados, los resultados obtenidos por la técnica de tinción vital, eran 103 veces más altos que los obtenidos con el método de recuento en placa, que está en conformidad con lo que cabría esperar, ya que bajo condiciones de estrés el

número de bacterias metabólicamente activas supera, con mucho, el número de bacterias cultivables.

Application of the direct epifluorescent filter technique as a rapid method in microbiological quality assurance in the meat industry

Autores: S.H. Qvist 1 and M. Jakobsen 2 *J Danish Meat Products Laboratory, Howistvej 13, 2000 Copenhagen, and -'AlfredJorgensen Laborato<vfor Fermentation Ltd., Frydendalsvej 30, 1809 Copenhagen, Denmark*

Fuente: International Journal of Food Microbiology, 2 (1985) 139-144.

Resumen:

Se realizó un estudio de comparación de las técnicas de filtración por epifluorescencia directa (direct epifluorescent filter technique DEFT) y recuento estándar en placa (standard plate count (SPC) para analizar los productos de carne cruda y tratada térmicamente. Los resultados más prometedores se han obtenido con la carne picada cruda, donde se encontró una buena concordancia entre DEFT y SPC . Estos productos tenían recuentos bacterianos de 10⁵/ g y superior; el coeficiente de correlación fue de 0,79. Para los productos cárnicos tratados por calor, existe mejor concordancia entre DEFT y SPC para los productos con un recuento alto al final de la vida útil (10⁵/g), que para los productos con bajo recuento. Sin embargo, se encontró en estos casos una información útil con DEFT, ya que era posible estimar aproximadamente el número de bacterias presentes antes del tratamiento térmico. El estudio demostró claramente que DEFT no podía distinguir entre células vivas y muertas, y también que esto no era un requisito previo para el uso de DEFT. Se concluyó que DEFT podría utilizarse con ventaja en un programa de garantía de calidad de la carne picada y que se puede comprobar que existe una especificación microbiológica de 10⁶/g. Sin embargo el conteo automático no se podría utilizar en este nivel. Esto limita la capacidad de 20 muestras por persona por día. Se espera que un mayor desarrollo del sistema DEFT va a superar este problema.

Growth, occurrence and development of septa in Plasmopara viticola and other members of the Peronosporaceae using light- and epifluorescence-microscopy

Autores: Andreas KORTEKAMP Institute for Phytomedicine (360), University of Hohenheim, D-70593 Stuttgart, Germany.

Fuente: Mycol. Res. 109 (5): 640–648 (May 2005). f The British Mycological Society

Resumen:

Aunque *Plasmopara viticola* causa mildiu de la vid en la mayoría, si no todos, los países productores de vino, muchos de los aspectos biológicos o químicos básicos se desconocen y por lo tanto se estudiaron los cambios histopatológicos durante el desarrollo de este patógeno. El fluorocromos Azul de anilina y Uvitex 2B se utilizaron con éxito en tinciones de hoja entera visualizando hifas intercelulares e investigando el desarrollo en esporangióforos. La aparición y la transferencia de citoplasma en esporangióforos se estudió con la ayuda de Chlorazol Negro E y floxina B. Aplicación de Chlorazol Negro E fue el método más fiable para diferenciar entre citoplasma y tabiques en esporangióforos debido a un alto contraste entre el citoplasma oscuro y el septo pálido. En *P. viticola*, los septos se encontraron en el tronco y las ramas de los esporangióforos, pero no en las hifas intercelulares, que estaba en contraste con otros oomicetos, tales como *P. tabacina*, *Pseudoperonospora cubensis* y *P. humuli*, donde se encontraron con frecuencia septos en el micelio. Con el fin de verificar la composición química de los septos, se digirieron esporangióforos usando quitinasa y B-1 ,3-glucanasa. Después de la tinción con Azul de anilina y Uvitex 2B, la intensa fluorescencia de los septos se conservó después de la aplicación de quitinasa pero no después de b-1 ,3-glucanasa, lo que indica que los septos se componen principalmente de b-1 ,3-glucanos. Pretratamientos de vid de hojas infectadas con 2-desoxi-D-glucosa (2-DOG) a bajas concentraciones (1-5 mM) dio lugar a una desorganización de la estructura esporangióforo de *P. viticola*, mientras que la producción de los septos no se vio afectada. Aplicación de 2-DOG en concentraciones más altas resultó en una longitud reducida de hifas intercelulares (10 mM) o inhibición total (50 mM) del micelio intercelular.

Por lo tanto, 2-DOG o sus análogos interfieren con la morfogénesis de *Plasmopara viticola* y pueden tener un efecto perjudicial sobre la propagación de este mildiu entre plantas.

Rapid Membrane Filtration-Epifluorescent Microscopy Technique for Direct Enumeration of Bacteria in Raw Milk

Autores: GRAHAM L. PETTIPHER,* RODERICK MANSELL, CHARLES H. MCKINNON, AND CHRISTINA M. COUSINS National Institute for Research in Dairying, Shinfield, Reading RG2 9AT, England.

Fuente: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Feb. 1980, p. 423-429.

Resumen:

Se utilizó la microscopía de epifluorescencia de filtración de membrana para el recuento directo de bacterias en la leche cruda. Las células somáticas se lisaron por tratamiento con tripsina y Triton X-100 de forma que se filtraron 2 ml de leche que contienen hasta 5×10^6 células / ml somáticas. La mayoría de las bacterias (ca. 80%) se mantuvieron intactas y se concentraron en la membrana. Después de ser manchadas con naranja de acridina, las bacterias son fácilmente contadas debido a que son fluorescentes bajo la luz ultravioleta. En el recuento del grupo de células de fluorescencia de color naranja en la membrana se obtuvo una buena correlación ($r = 0,91$) con la concentración de gérmenes correspondiente para las leches de granja, cisterna y silos. Las diferencias entre los recuentos obtenidos por diferentes operadores y entre el número de grupo de la membrana y el recuento de placa no fueron demasiado significativas. La técnica es rápida, de menos de 25 min, de bajo costo, y es adecuado para las leches que contienen 5×10^3 a 5×10^8 bacterias por ml.

Use of the Direct Epifluorescent Filter Technique for the Enumeration of Viable and Total Acetic Acid Bacteria from Vinegar Fermentation

Autores: M. M. Mesa, M. Macías, D. Cantero, and F. Barja.

Fuente: Journal of Fluorescence, Vol. 13, No. 3, May 2003.

Resumen:

Se utilizó un método de tinción de epifluorescencia rápida con el kit LIVE / DEAD[®] Viabilidad bacteriana BacLight[™] para diferenciar recuentos de bacterias de ácido acético en el vinagre de fermentación viables y totales. Los resultados obtenidos se compararon con los de otras técnicas de medición: 4,6-diamino-2 fenil indol (DAPI) y 5-ciano-2,3-ditolil cloruro de tetrazolio (CTC) y los recuentos de colonias. Los recuentos totales con BacLight[™] fueron comparables con DAPI (que difieren en 3.5%). Los recuentos de viables con BacLight[™] fueron similares a los recuentos de CTC pero considerablemente mayor que las células formadoras de colonias en placas.

Microcolony Epifluorescence Microscopy for Selective Enumeration of Injured Bacteria in Frozen and Heat-Treated Foods

Autores: UBALDINA M. RODRIGUES AND ROHAN G. KROLL* Department of Microbiology, AFRC Institute of Food Research, Reading Laboratory, Shinfield, Reading RG2 9AT, United Kingdom.

Fuente: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Apr. 1989, p. 778-787.

Resumen:

Ha sido desarrollado un método rápido (<6 h) para enumerar selectivamente coliformes, pseudomonas, estafilococos que implica contar micro colonias crecidas en la superficie de membranas de policarbonato bajo condiciones selectivas. El método no es directamente aplicable a los alimentos que contienen bacterias dañadas debido a la mala formación o una incapacidad para formar microcolonias en condiciones selectivas. Sin embargo, la introducción de 3 a 5-h en triptona caldo de soja paso de reanimación permitió que el método obtuviera estimaciones fidedignas de estos organismos en una variedad de alimentos congelados y procesados por calor. Bajo condiciones no selectivas, es decir, para los recuentos totales, el método de microcolonias que se utiliza es un conteo rápido de bacterias viables en los alimentos tratados con calor, pero estos resultados también se hicieron más consistentes por la introducción de un paso de reanimación. Este método hace que los resultados de estos alimentos estén disponibles mucho más rápido que los métodos convencionales de enumeración.

Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process

Autores: Baena-Ruano , C. Jiménez-Ot , I.M. Santos-Dueñas, D. Cantero-Moreno, F. Barja , I. García-García Department of Chemical Engineering, Faculty of Sciences, University of Córdoba, Campus Universitario de Rabanales, Ctra. (a) Madrid, Km 396, 14071 Córdoba, Spain, Department of Chemical Engineering, Faculty of Sciences, University of Cádiz, Campus Rio San Pedro, 11510 Puerto Real, Cádiz, Spain, Laboratory of Bioenergetics and Microbiology, University of Geneva, 10, ch. des Embouchis, 1254 Jussy-Geneva, Switzerland.

Fuente: Process Biochemistry 41 (2006) 1160–116.

Resumen:

Se aplicaron un método de tinción rápida de epifluorescencia utilizando el Kit de LIVE/DEAD BacLight viabilidades bacterianas (BacLight™) y recuentos directos en cámara de Neubauer viables y totales de bacterias en diferentes etapas de la toma de vinagre. Kit de BacLight se compone de una mezcla de dos ácidos nucleicos: SYTO 9™ y yoduro de propidio. Estos compuestos se diferencian tanto en sus características espectrales y en su capacidad de penetrar en las células bacterianas viables. SYTO 9 penetra en todas las membranas bacterianas y tiñe las células de color verde, mientras que el yoduro de propidio sólo penetra en las células con membranas dañadas, y la combinación de los dos compuestos produce células fluorescentes rojos. Se encontraron las condiciones óptimas de dilución y de incubación para ser 1:5 y 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad, respectivamente. Células viables (Verde) y células totales (rojo más verde), se pueden obtener en una etapa de tinción y, por tanto se pueden contar simultáneamente. Los resultados obtenidos con esta técnica se compararon con los de otras técnicas de medición (recuentos de colonias y citometría de flujo).

A Fluorescence Microscopy Method for Determining the Viability of Entomophthoralean Fungal Spores'

Autores: HEIDI FIRSTENCEL, TARIQ M. BUTT, AND RAYMOND I. CARRUTHERS U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Plant Protection Research Unit, Federal Plant, Soil and Nutrition Laboratory, Cornell University, Ithaca, New York MS53.

Fuente: Journal of invertebrate pathology 55, 258-264 (1990).

Resumen:

Se evaluó de forma paralela la viabilidad de los conidios de dos especies de hongos Entomophthorales mediante estudios de tinción con fluorocromo y la germinación vital. Diacetato de fluoresceína (FDA) indica la viabilidad cuando las células emiten fluorescencia de color amarillo-verde, mientras que el yoduro de propidio (PI) indica no viabilidad cuando las células emiten fluorescencia roja. Se utilizaron diversos métodos para inducir Entomophaga maimaiga y Zoophthora radicans, incluida la exposición a la radiación electromagnética, etanol, o las altas temperaturas. Después de cada tratamiento, la mitad de los conidios fueron teñidos o bien con la FDA y PI o mantenerse en unas condiciones ideales para la evaluación de la germinación. En experimentos separados, esporas en reposo de Entomophaga gtylli y E. maimaiga fueron tratadas en autoclave o con etanol. La tinción vital se utilizó para evaluar la viabilidad de las esporas en reposo. La FDA y PI se utilizaron para evaluar la viabilidad de E. maimaiga y Z. radicans con exactitud y precisión en comparación con las pruebas de germinación estándar. No se encontraron diferencias en los resultados de las pruebas comparativas si los conidios fueron muertos con etanol, con la radiación electromagnética, o con las altas temperaturas. En cuanto a la evaluación de viabilidad de las esporas en reposo la FDA y PI no eran eficaces debido a la penetración limitada de estas manchas a través de las gruesas paredes de las esporas de E. maimaiga y E. gtylli y también debido a la autofluorescencia de sus esporas en reposo.

Suitability of the fluorescent techniques for the enumeration of probiotic bacteria in commercial non-dairy drinks and in pharmaceutical products

Autores: Johanna Maukonen *✉*, Hanna-Leena Alakomi, Liisa Nohynek, Katri Hallamaa, Sanna Leppämäki, Jaana Mättö, Maria Saarela *VTT Biotechnology, P.O. Box 1500 (Tietotie 2), FIN-02044 VTT, Finland*

Fuente: Food Research International 39 (2006) 22–32.

Resumen:

Se estudió la idoneidad de las técnicas fluorescentes para la evaluación de la calidad microbiológica de las bebidas no lácteas probióticas y productos farmacéuticos probióticos. La optimización del método se realizó con cultivos puros de cepas probióticas detectados en productos comerciales (que representan las especies *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*). En total fueron probados siete tinciones de viabilidad fluorescentes diferentes combinadas con microscopía de epifluorescencia y XOW citometría. La mayoría de las tinciones aplicables ChemChrome y Kit Viabilidad BacLight vivas / muertas se utilizaron además para los estudios de viabilidad de los productos probióticos comerciales. Los productos estudiados demostraron ser de buena calidad. Todos los productos indicaban en la etiqueta que contenían la bacteria probiótica y que los niveles de bacterias que viven eran razonables por dosis (10^8 - 10^{10} células para la dosis diaria recomendada de los productos farmacéuticos y de 10^8 a 10^9 células por cada 100 ml de bebida). Los resultados obtenidos con las tinciones fluorescentes estaban de acuerdo con los resultados obtenidos con los cultivos, lo que hace a las técnicas fluorescentes alternativas y aplicables para la evaluación rápida de la viabilidad de los productos probióticos. Especialmente el ensayo Xuorometry de nuevo desarrollo, con BacLight demostró ser rápido y preciso.

The Use of Epifluorescence Microscopy to Determine Surface Hygiene

Autores: J. T. Holah, R. P. Betts & R. H. Thorpe *Campden Food and Drink Research Association, Chipping Campden. Gloucestershire, GL55 6LD, UK.*

Fuente: International Biodeterioration 25 (1989) 147-153

Resumen:

Dentro de la industria alimentaria se ha establecido una necesidad de evaluar la contaminación microbiana en superficies en contacto con alimentos mediante técnicas rápidas. Se desarrolló un método, mediante la adaptación de la técnica de DEFT, para teñir y enumerar microorganismos por microscopía de epifluorescencia directa. El método se evaluó mediante el desarrollo de biopelículas de diversos organismos en una serie de superficies de calidad alimentaria, y en entornos de fábrica usando placas de muestreo de prueba. Se llevaron a cabo ensayos de limpieza para examinar la capacidad del método para detectar bajos niveles de contaminación de la superficie. El método se demostró para enumerar los organismos de superficie rápidamente (<15 min) dentro de la serie de 3×10^5 - 5×10^7 colonias /cm². No se experimentaron dificultades en la evaluación de diferentes organismos, ni la mayoría de las superficies de calidad alimentaria. La técnica puede resultar útil para permitir un control en tiempo real para la evaluación de la higiene de la superficie.

2. TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS***Epifluorescencia***

La determinación microbiológica de células presentes en vino se basa generalmente en la técnica de cultivo en placa de Petri.

Es una técnica fácil de realizar, pero tiene algunas desventajas: (*Berta y Spertino, 1998*).

- a) presenta una tendencia a sobreestimar el número de células presentes;
- b) para levaduras, el tiempo de respuesta y la precisión son aceptables, pero, para bacterias, se requiere un tiempo de incubación más largo que puede ser demasiado largo para prever accidentes de fermentación o de refermentación, y así evitar las paradas de fermentación o modificar las condiciones de embotellado durante el trasiego;
- c) no cuenta bacterias o levaduras presentes en agregados o en microcolonias, las cuenta como si fuera una sola célula y
- d) no tiene en cuenta las células no vitales.

Debido a todas estas desventajas a partir de 1974 se comenzó a utilizar la excitación de fluorescencia con luz reflejada (epifluorescencia) en la industria alimentaria para poner a punto un método rápido y eficiente de recuento de microorganismos (Berta y Spertino, 1998).

Esta técnica se basa en un sistema que transmite luz a corta longitud de onda al preparado, previamente coloreado con un fluorocromo. Éste la absorbe y emite luz a una longitud de onda mayor que la incidente (**Figura 9**). Para evidenciar estas fluorescencias debe delimitarse con un primer filtro coloreado el cuál es la banda de excitación, generalmente la ultravioleta o la del azul-violeta, y disponer, tras el objeto, un segundo filtro, "filtro de intercepción", que absorbe el residuo de la luz excitadora para no dejar pasar más que la fluorescencia (Berta y Spertino, 1998).

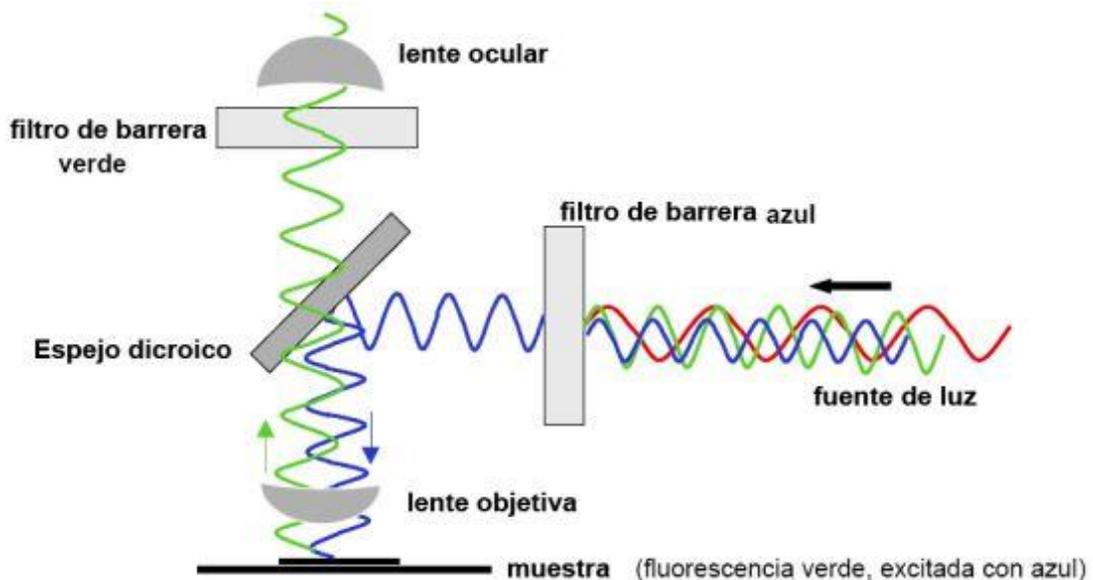


Figura 9. Funcionamiento de la técnica de epifluorescencia.

La epifluorescencia (DEFT, direct epifluorescence filter technique), es una técnica que permite de forma rápida y segura determinar todos los microorganismos viables que pueden estar presentes en el vino y tiene la ventaja que al utilizar reactivos específicos denominados fluoróforos se puede determinar de forma clara y precisa tanto las células viables como las no viables y a su vez detectar aquellos microorganismos que no son detectables por los métodos de cultivo tradicional por encontrarse en estado viable pero no cultivable (VNC).

La cuantificación por epifluorescencia se basa en el uso de marcadores fluorescentes que permiten la cuantificación de las células viables y no viables de forma simultánea. Para ello, se utiliza entre otros, un kit de viabilidad bacteriana (LIVE/DEAD® BacLight bacterial viability kit (Molecular Probes) que se fundamenta en la diferente permeabilidad de la membrana plasmática dependiendo del estado fisiológico de la célula. Este sistema es un método rápido de tinción de epifluorescencia que utiliza dos marcadores fluorescentes, el SYTO9 y el yoduro de propidio, que se diferencian por sus características espectrales y su capacidad de penetrar en las células bacterianas viables. El fluorocromo SYTO9 tiñe todas las células, independientemente del estado de su membrana citoplasmática. En contraste, el yoduro de propidio penetra solo en las células que tienen la membrana dañada, causando una reducción en la intensidad fluorescente del SYTO9 cuando ambos marcadores están presentes. Por tanto las células que tienen la membrana citoplasmática intacta se tiñen de verde y se considerarán viables mientras que las bacterias que tienen dañada la membrana se visualizan de color rojo y se considerarán no viables (**Figura 10**).

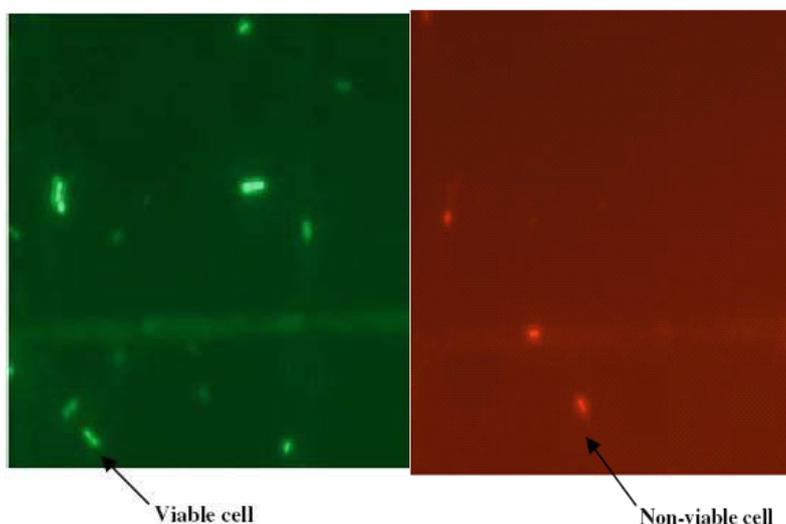


Figura X. Diferencia entre células viables y no viables con los distintos marcadores fluorescentes.

Para la realización de la cuantificación por epifluorescencia, se necesita de un microscopio de epifluorescencia (**Figura 11**).



Figura 11. Microscopio de Epifluorescencia del Laboratorio Dominio de Pingus S.L.

El microscopio de epifluorescencia es un microscopio óptico. En un microscopio óptico convencional la luz atraviesa la muestra estudiada, mientras que en un microscopio de epifluorescencia la luz que incide sobre la muestra estudiada no la atraviesa sino que la misma lente ilumina y recibe la luz emitida por la muestra. Su funcionamiento que podemos observar en la **Figura 12** se basa en la propiedad de fluorescencia que tienen ciertas moléculas denominadas fluorocromos.

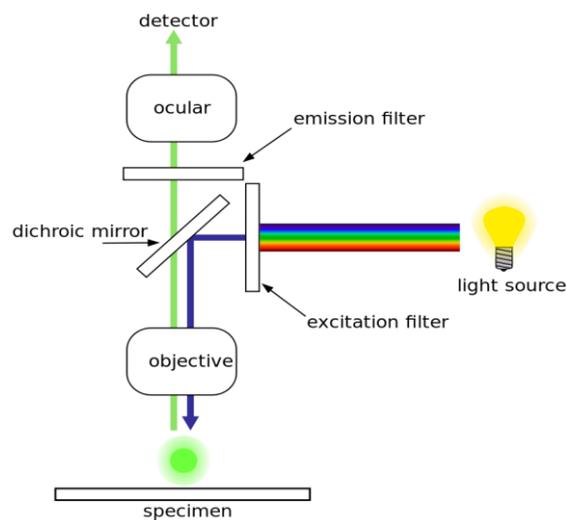
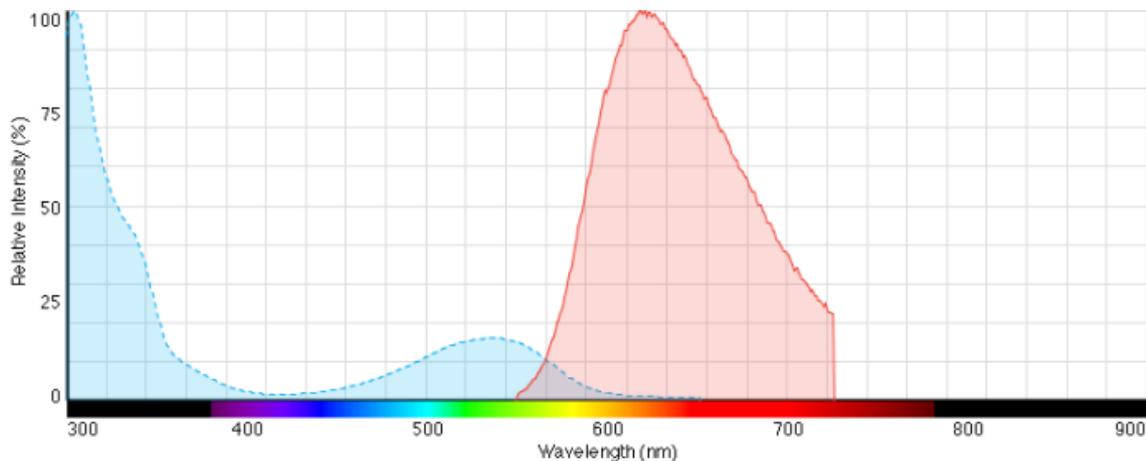


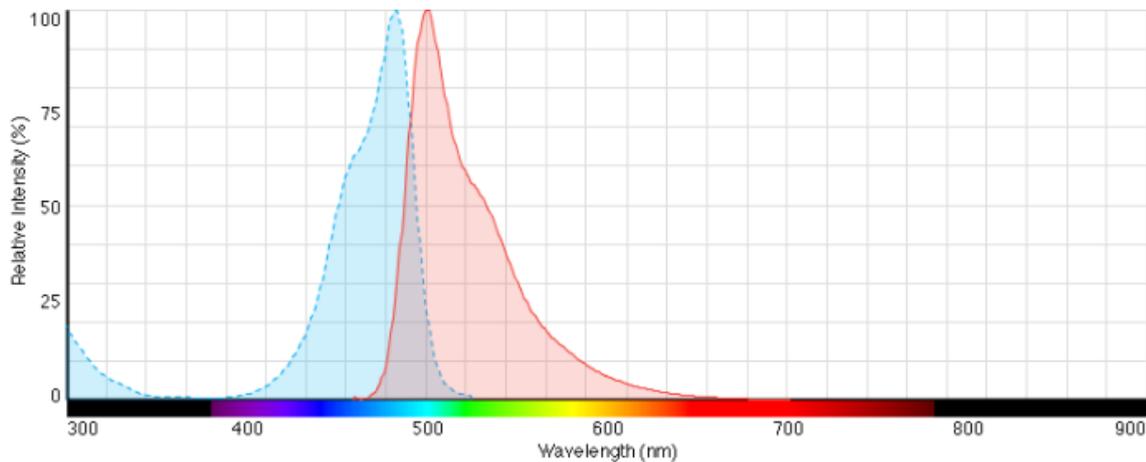
Figura 12. Funcionamiento de un microscopio de epifluorescencia.

Los **fluorocromos** son sustancias que tienen la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando son excitados por un fotón incidente de una longitud de onda característica. La parte de la molécula que emite la fluorescencia se denomina **fluoróforo**. Las moléculas de fluorocromo se utilizan para marcar ciertas estructuras celulares destacándolas del resto de los elementos que componen la célula. Esto permite identificar distintas moléculas o conjuntos de moléculas. El fluorocromo puede tener afinidad por distintos elementos celulares o puede ser acoplado químicamente a otras moléculas como anticuerpos que reconocen específicamente cierto componente celular.

Los más usados en el mundo de la enología para la epifluorescencia como ya hemos dicho antes son los que trae el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD® formado por los compuestos SYTO9 y Yoduro de Propidio cuyos espectros de excitación y de emisión se representan en la **Figura 13**:



Espectro de excitación (304nm) /emisión (617nm) de **Yoduro de Propidio**



Espectros de Excitación (482nm) /Emisión (501 nm) de **SYTO 9**

Figura 13. Espectros de Excitación y de emisión de Yoduro de Propidio y SYTO9

Existen a parte de la Epifluorescencia otras técnicas de cuantificación de microorganismos como pueden ser:

Citometría de flujo.

Esta técnica nos permite cuantificar de manera rápida y exacta el número levaduras viables de una muestra. La citometría de flujo se basa en la dispersión de la luz por parte de las células y la utilización de fluorocromos para poder discriminar entre levaduras vivos y muertos. Las células vivas tienen la membrana intacta y por lo tanto son impermeables a fluorocromos como el yoduro de propidio, en cambio fluorocromos como el naranja de tiazol son permeables a todas las células, vivas o muertas. Por tanto, la utilización de estos dos tipos de fluorocromos nos proporciona un método para determinar viables.

La citometría de flujo ha sido aplicada a la industria enológica obteniendo unos resultados altamente reproducibles y con una excelente correlación con respecto a los obtenidos por métodos tradicionales, como el recuento en placa (*Breeuwer et al., 1994; Bruetschy et al., 1994*).

Recientemente, (*Malacrino te al. (2001)*) ha utilizado esta técnica para cuantificar levaduras viables en vino llegando a unos límites de detección de 10^3 células / ml.

PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (QPCR)

La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (QPCR) se basa en detectar la señal emitida por un dador fluorescente cuando se genera el producto de amplificación durante la reacción de PCR. Esta señal fluorescente aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de la reacción. Para realizar la reacción de PCR se puede utilizar como molécula molde DNA o RNA (previa reacción de retrotranscripción). La utilización del RNA como molécula molde tiene la ventaja que permite una mejor cuantificación de las células viables.

La fluorescencia se puede dar a través de:

(a) Agentes intercalantes.

Son moléculas fluorescentes que se intercalan en la doble cadena de DNA. La más utilizada es el SYBR Green I (**Figura 14**). Estas moléculas sólo emiten señal fluorescente cuando están unidas a una doble cadena de DNA. El inconveniente de estos fluorocromos es que se unirán a todas las dobles cadenas de ADN y por lo tanto también se medirá la fluorescencia procedente de productos de amplificación inespecíficos.

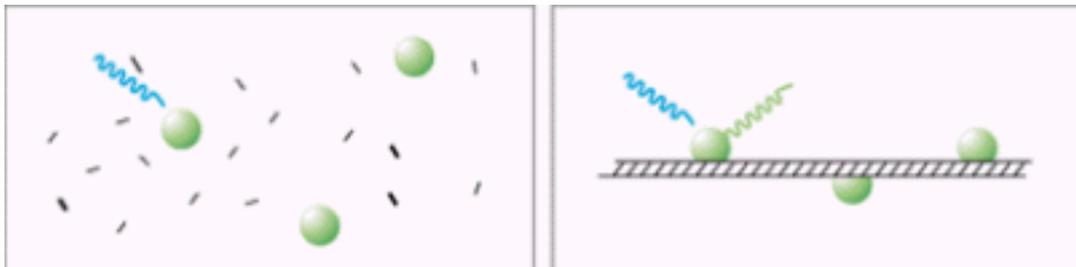


Figura 14. Molécula SYBR Green I, uniéndose a una cadena de ADN

(b) Sondas de hibridación.

Las más utilizadas son las sondas TaqMan (**Figura 15**). Estas sondas tienen un marcador fluorescente en el extremo 5' y una molécula (llamada "quencher") que absorbe la fluorescencia que emite el marcador fluorescente del otro extremo. Mientras estas dos moléculas están unidas no se detecta fluorescencia.

La sonda se une a una secuencia ya medida, específica del fragmento que queremos amplificar que sintetiza la cadena complementaria, la sonda se degrada por acción exonucleasa de la Taq polimerasa liberándose el marcador que está libre y por tanto, emitirá fluorescencia.

Una alternativa a las tradicionales sondas TaqMan son las llamadas sondas TaqMan[®] MGB (Minor Groove Binder) (Applied Biosystems). Estas sondas también están marcadas con un fluorocromo en el extremo 5' y una molécula "quencher" en el extremo 3', pero son más mucho más cortas que las tradicionales (12-15 nucleótidos) y se unen al surco menor del DNA. Este hecho da mayor estabilidad en la hibridación de la sonda y permite discriminar secuencias con tan sólo un nucleótido de diferencia.

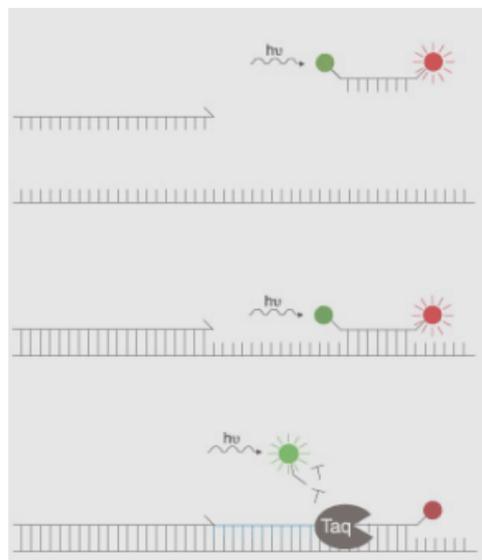


Figura 15. Proceso de la sonda TAqMan

Los resultados de la PCR cuantitativa se visualizan mediante la integración de la señal fluorescente y se reflejan en una curva de amplificación (**Figura 16**). Se establece una señal umbral, por encima de la que se considera una lectura positiva. El ciclo umbral (CT) será el ciclo en que se detecta por primera vez una señal de fluorescencia superior a la de la señal umbral. Este ciclo CT es inversamente proporcional a la cantidad inicial de DNA. Y debido a que se produce un incremento de la fluorescencia medible y proporcional al número de copias de la secuencia de DNA de partida, como resultado podemos obtener una recta de calibrado que permite la cuantificación del número de células presentes en una muestra.

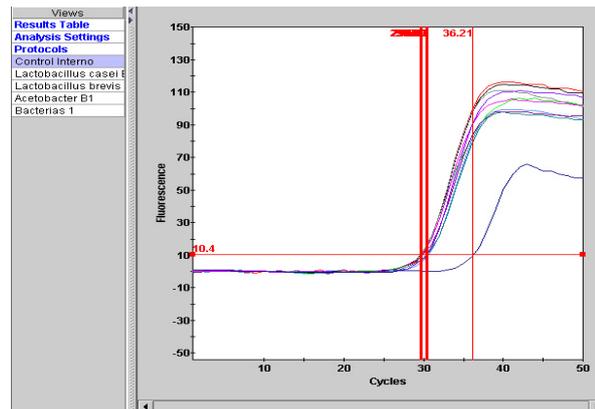


Figura 16. Curva de amplificación con el ciclo Umbral.

La PCR en tiempo real se ha convertido en una herramienta muy útil para la detección y enumeración de microorganismos debido a su gran especificidad, rapidez y sensibilidad. Se ha utilizado de manera muy extensa para cuantificar especies patógenos en muestras clínicas (Lyons et al., 2000; Brinkman et al., 2003; Bu et al., 2005; Trama et al., 2005), pero también para la detección de microorganismos alterantes de alimentos (BLEVE et al., 2003; Casey y Dobson, 2004) y microorganismos relacionados con el vino. Para establecer un mayor control de la población de bacterias que podrían ser perjudiciales para el vino durante la fermentación alcohólica y después de embotellado, diversos autores han desarrollado la QPCR para detectar directamente del vino bacterias acéticas y lácticas (González et al., 2006) (Pinzani et al., 2004; Neeley et al., 2005). En este último caso, también para poder evaluar de manera más rápida la fermentación maloláctica y aplicar medidas correctivas cuando sean necesarias. Pero, la PCR a tiempo real, también ha sido aplicada para la detección y cuantificación de levaduras vínicas.

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

Esta técnica permite la identificación y cuantificación “in situ” de los microorganismos mediante el diseño de sondas de DNA marcadas por fluorescencia que hibridan de forma específica con el género o especie que queremos determinar. La detección se realiza por microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Los pasos básicos del protocolo del FISH se muestran en la **Figura 17**. La principal ventaja de esta técnica es que permite identificar y cuantificar de forma rápida y directa los microorganismos sin necesidad de cultivo previo ni de extracción de DNA.

Mientras que los principales inconvenientes son su coste y que la presencia de algunos compuestos como los polisacáridos, compuestos fenólicos, etc. presentes en el vino pueden interferir o enmascarar la fluorescencia.

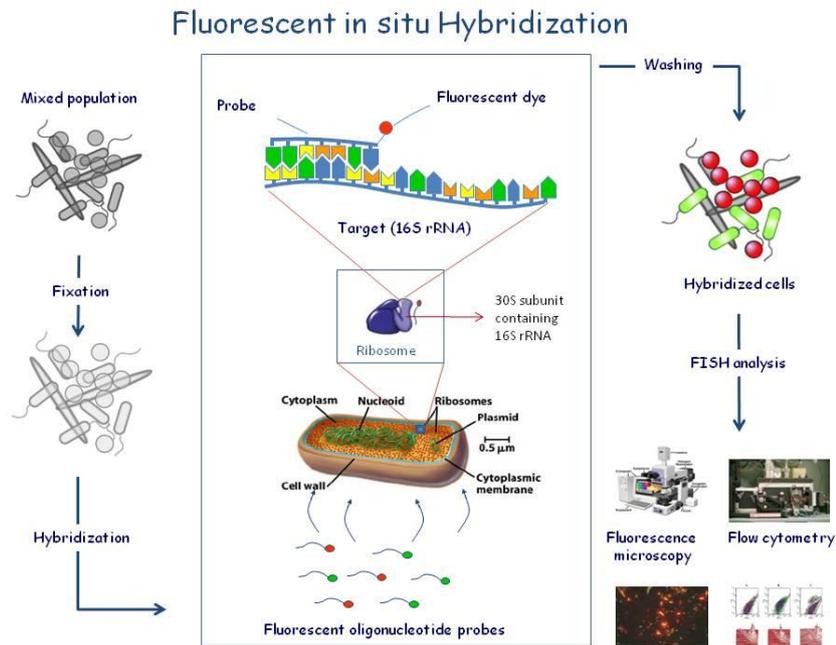


Figura 17. Protocolo a seguir en FISH

2.1 COMPARATIVA DE TÉCNICAS

Todas estas técnicas explicadas tienen sus ventajas e inconvenientes. Y unas son complementarias de las otras. Así en la Tabla 1 se puede observar la comparación de las distintas técnicas que se pueden utilizar.

	Cultivo sobre medio específico	Análisis al microscopio	Epifluorescencia	Citometría de flujo	PCR Tiempo Real Scorpion
Principio	Cultivo sobre medio sintético específico	Observación microscópica	Marcaje de células por fluorescencia. Cuantificación de la señal fluorescente	Marcaje por fluorescencia no específica de células vivientes	PCR cuantitativo en tiempo real
Tiempo de respuesta	8-10 días	15 minutos	4 horas	< 15 minutos	8 horas
Específico	Depende de la especificidad el medio de cultivo	No específico	Sí específico	No específico	Fragmentos+ sondas específicas
Sensibilidad	Subestimación de la población potencialmente peligrosa	100.000 cell/ml	1.000 a 10.000 cell/ml	200-1.000 cell/ml	10 cell viables /100ml
Precisión	La baja viabilidad de las células debido a las condiciones estresantes del vino puede conducir a resultados de falsos negativos	Las morfologías ambiguas de microorganismos pueden fácilmente desembocar en identificaciones erróneas	No especificidad y fiabilidad	Las morfologías ambiguas de microorganismos pueden fácilmente desembocar en identificaciones erróneas	Control interno. No falsos positivos
Aplicación de la técnica	Fácil puesta a punto, equipamiento poco costoso	Fácil puesta a punto, poco coste.	Mano de obra cualificada. Material específico	Mano de obra cualificada. Material específico	Mano de obra cualificada. Material específico
Ventajas	Poco costoso	Poco costoso	Económico, rápido, cuantitativo. Detecta células viables no cultivables (VNC)	Resultados muy rápidos	Rápido, sensible, altamente específico, cuantitativo
Desventajas	Retraso en la respuesta. No detecta las células viables no cultivables (VNC)	Limitación en la técnica por ser inespecífica	Poca sensibilidad. Muy específico	Limitación en la técnica por ser inespecífica. Aplicable solamente cuando la fermentación alcohólica está terminada o bloqueada	Costoso. Detecta microorganismos viables pero también no viables

Tabla 1. Comparación de las distintas técnicas para detectar microorganismos.

3. EXPERIMENTACIÓN

El trabajo experimental se realiza en el Laboratorio de la empresa Dominio de Pingus S.L.

Se realizó el análisis microbiológico cualitativo y cuantitativo de distintos depósitos de vino recién trasegado por los métodos de cultivo en placa, Epifluorescencia y PCR a tiempo real para determinar la población de bacterias que contenían.

Una vez realizadas todas estas técnicas, se compararon los resultados.

3.1 CULTIVO EN PLACA:

Se realizó la siembra del vino por triplicado en los distintos medios de cultivo para bacterias acéticas, bacterias lácticas, y bacterias totales.

- Medio de cultivo de *bacterias acéticas*: formado por caldo MRS, agar y le añadimos antibióticos como la penicilina para inhibir el crecimiento en estas placas de bacterias lácticas y pimaricina para inhibir el crecimiento de levaduras.
- Medio de cultivo de *bacterias lácticas*: formado por caldo MRS, agar y glicerol y le añadimos como antibiótico pimaricina para inhibir el crecimiento de levaduras.
- Medio de cultivo de *bacterias Totales*: formado por caldo MRS, agar y como antibiótico pimaricina para inhibir el crecimiento de levaduras.

- Medio de cultivo de *Oenococcus oeni*: formado por Extracto de levadura, triptona, glucosa, fructosa, citrato diamónico, zumo de tomate, Cisteína, agua y agar.

Para cada una de las placas sembramos 100 µl de vino. Y dejamos incubar en la estufa 12 días a 28°C. Para el caso de bacterias lácticas incubamos en la estufa pero en una jarra de anaerobiosis para generar una atmósfera satura de CO₂ y a 37°C.

Una vez pasados los 12 días sacamos las placas de la estufa y contamos las distintas colonias que se nos han formado. (**Figura 18**).

Y comprobamos al microscopio mediante la tinción de Gram si las colonias que hemos obtenido en las distintas placas son bacterias Acéticas o Lácticas. (**Figura 19**).

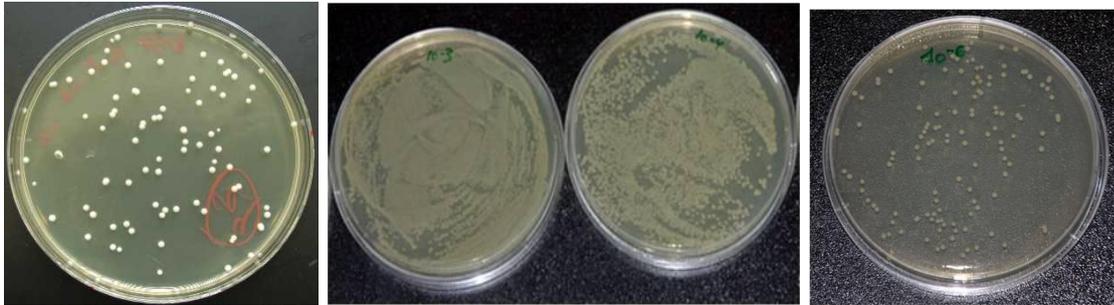


Figura 18. Distintos medios de cultivo con colonias de bacterias

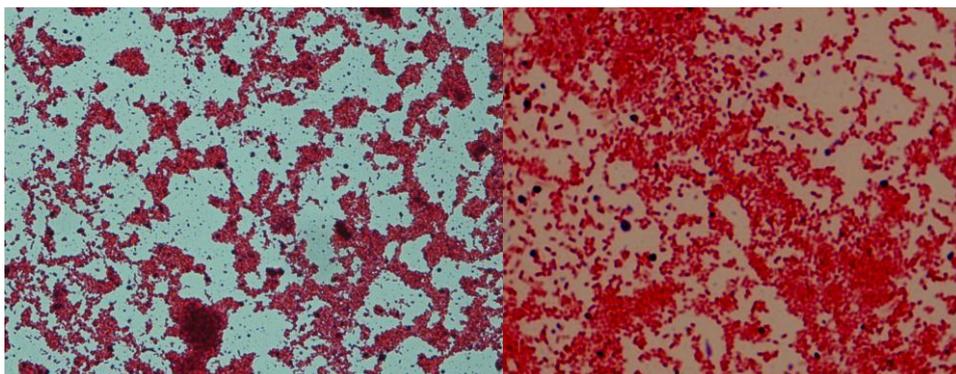


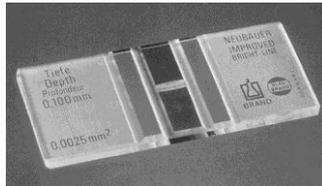
Figura 19. Ejemplos de Tinciones de Gram de las distintas colonias obtenidas

3.2 EPIFLUORESCENCIA:

Se siguió el siguiente protocolo: *(Para Bacterias en muestras de Vino)*

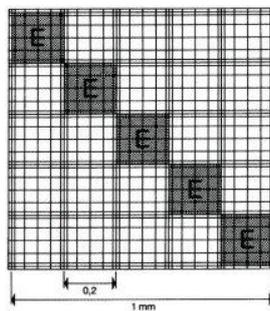
- Centrifugamos y concentramos 1,5 ml de muestra 10 min a 120000 rpm. (La concentración del volumen de vino puede variar en función de la etapa en la cual se encuentre el vino. Es decir, depende de si tenemos un vino joven que concentraremos menos cantidad o un vino de crianza para el cuál concentraremos más volumen.
- Eliminamos el sobrenadante y nos quedamos con el pellet.
- Resuspendemos el pellet con 1 ml de agua estéril y lo llevamos a un tubo eppendorf. (Este proceso se puede repetir una vez más para lavar)
- Centrifugamos de nuevo 10 min a 120000 rpm.
- Eliminamos el sobrenadante y resuspendemos el pellet "limpio" en 100 µl de agua estéril.
- Teñimos con colorantes: Preparamos un mix con la misma cantidad de los colorantes del kit LIVE/DEAD® BacLight bacterial viability kit (Molecular Probes) y añadimos 0,5 µl de ese mix.
 - Yoduro de Propidio (rojo, penetra sólo en las membranas de células muertas)
 - SYTO (Verde, penetra a través de todas las membranas)
- Dejamos la muestra a Tª ambiente durante 20 minutos y al abrigo de la luz.
- Observamos al microscopio: ponemos la muestra en la cámara de Neubauer y contamos los microorganismos.

La cámara de Neubauer es una cámara de recuento que se utiliza para determinar el número de partículas por unidad de volumen de un líquido al microscopio.



Existen varias formas de conteo, la utilizamos en el laboratorio de Dominio de Pingus S.L. es la siguiente:

Se cuentan las células tanto vivas como muertas que observamos al microscopio en la diagonal de la cámara de Neubauer y después realizamos el siguiente cálculo:



$$\text{Células/m} = \frac{\text{Partículas contadas}}{\text{superf. cont (0,2mm}^2) \times \text{profundidad cámara (0,1 mm)} \times \text{dilución}}$$

Así el conteo nos queda:

$$\text{Células/ml} = \text{células contadas} \times 2 \times \text{dilutor} \times 2 \times 10^5$$

Se realizó el conteo de los distintos microorganismos viables observando también su forma al microscopio para distinguir entre bacterias lácticas o acéticas. Así como también los Oenococcus que existan. **(Figura 20)**

$$\% \text{Viabilidad} = \frac{n^{\circ} \text{ células vivas}}{n^{\circ} \text{ células totales (vivas+muertas)}} \times 100$$

Así lo que observamos al microscopio es:

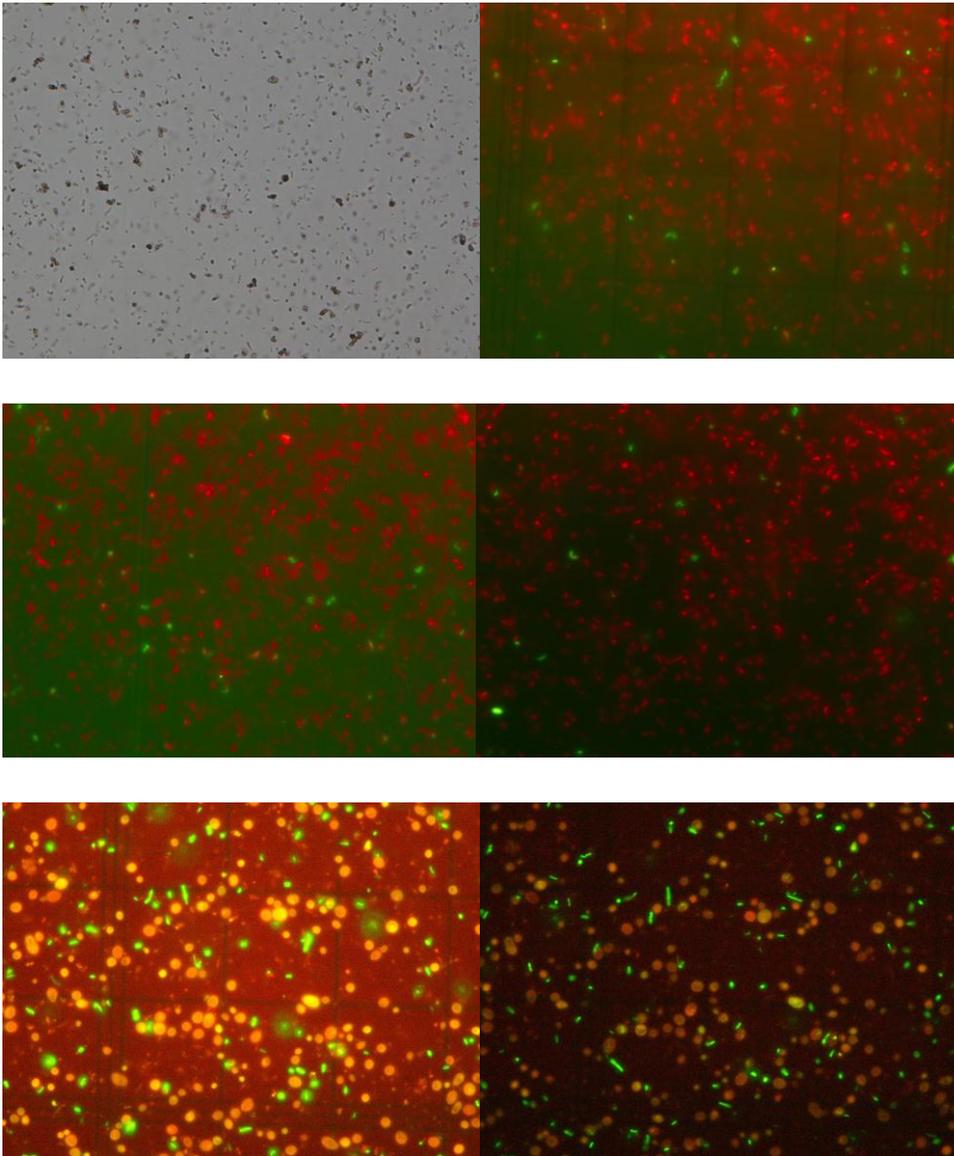


Figura 20. Imágenes al microscopio de las distintas bacterias mediante Epifluorecencia

3.3 PCR A TIEMPO REAL

En el laboratorio de Dominio de Pingus S.L. tenemos un equipo SmartCycler II para PCR en tiempo Real.



Este sistema es un sistema de detección y amplificación de ADN/ARN basado en el módulo I-CORE™ (Intelligent Cooling/Heating Optical Reaction), (**Figura21**) controlado por microprocesador. Cada bloque de procesamiento SmartCycler II contiene dieciséis módulos I-CORE, que pueden programarse y controlarse de forma independiente, cada uno de ellos con una posición de reacción.

Este equipo está indicado para la realización de ensayos de diagnóstico in vitro en los que es preciso aplicar ciclos de refrigeración y calentamiento rápidos. Las secuencias específicas pueden detectarse con la ayuda de sondas de hibridación.

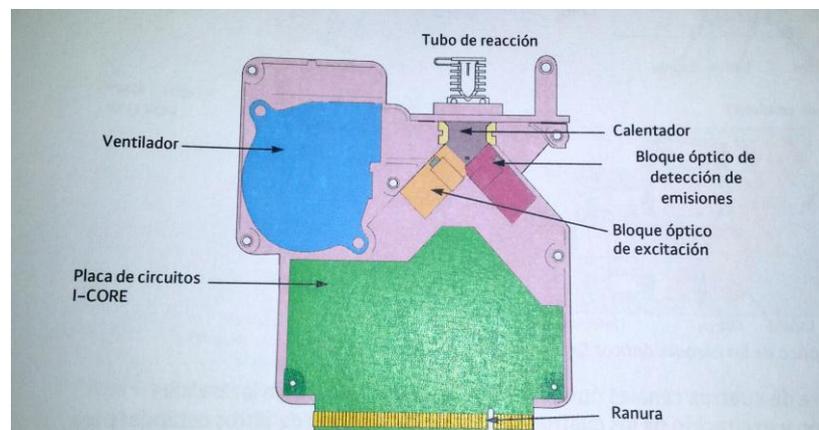


Figura 21. Modulo I-CORE de Smart Cyler II

La cámara consta de dos placas calentadoras elaboradas de un material cerámico. Estas placas cuentan con una gran conductividad térmica para garantizar una temperatura constante y la transferencia de calor a gran velocidad. Las resistencias se incorporan sobre las placas de cerámica utilizando la tecnología de capa fina y su temperatura se controla a través de una sonda.

La refrigeración se obtiene mediante un ventilador de gran eficiencia que mueve el aire ambiental a través del de las placas del calentador. La temperatura de cada cámara cicladora se controla mediante el firmware del instrumento. Este firmware incorpora un bucle de control para garantizar un calentamiento rápido de las placas y controlar que se alcance el punto de temperatura deseado, lo que permite que se produzcan cambios rápidos y precisos en el temperatura del líquido que se encuentra en el tubo de reacción de SmartCycler.

El sistema óptico SmartCycler (**Figura 22**) utiliza diodos emisores de luz de alta intensidad fotodetectores de silicio y filtros adecuados para realizar tareas de excitación y detección de cuatro bandas espectrales distintas. Incluye dos bloques ópticos: un módulo excitador y un módulo detector, ambos de cuatro colores. (figura)Estos bloques están colocados en el dispositivo de manera que sus orificios coinciden con las ventanas ópticas del tubo de reacción SmartCycler, lo que permite llevar a cabo la excitación y la detección de emisiones de la mezcla de reacción.

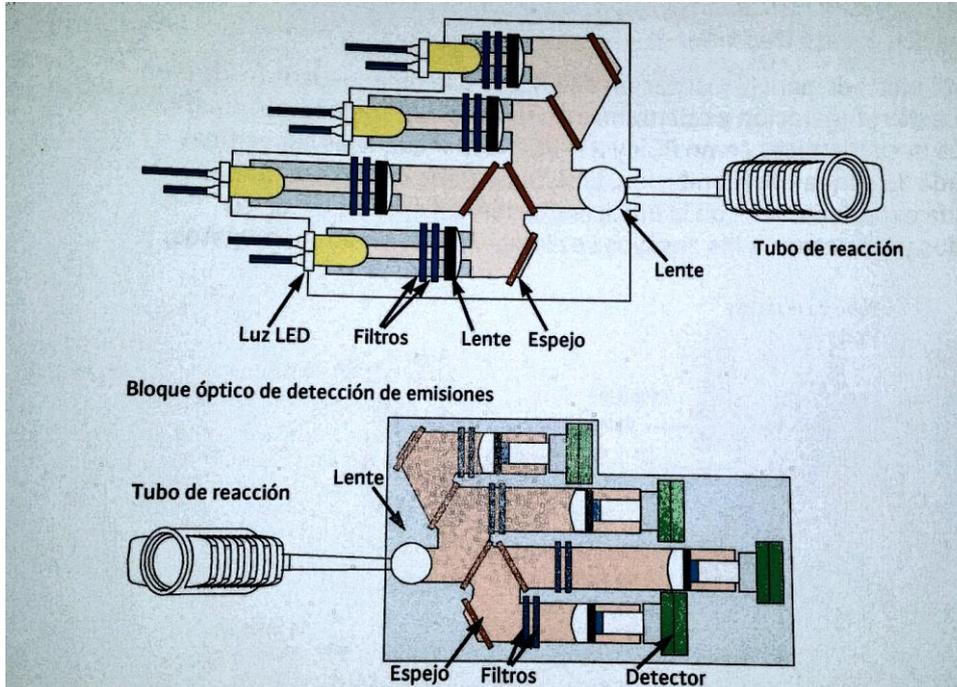


Figura 22. Sistema óptico de Smart Cycler II

El sistema óptico consta de cuatro canales ópticos. A continuación en la **Tabla 2** se representan las bandas espectrales de detección y de excitación de los cuatro canales con el conjunto con el conjunto de filtros estándar para FAM, TET, Cy3, Alexa Fluor 532, Texas Red y Alexa Fluor 647.

Canal óptico	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Fluorocromos calibrados
1	450–495	510–527	FAM
2	500–550	565–590	Cy3™/TET Alexa Fluor 532
3	565–590	606–650	Texas Red™
4	630–650	670–750	Cy5™ Alexa Fluor 647

Tabla 2. Rangos de detección y excitación de los canales de Smart Cyclor II

Mediante el uso de sondas marcadas con diferentes fluorocromos, hasta 4 detecciones pueden ser detectadas con la mezcla de un solo tubo. El sistema óptico permite recopilar datos de los cuatro canales. Los espectros de emisión de los fluorocromos podrían superponerse, de modo que, para separar la señal correspondiente de cada fluorocromo, deberán utilizarse los algoritmos adecuados al análisis de datos y calibración.

Las sondas de temperatura de la cámara de reacción térmica se calibran a $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en función de NIST. Durante el proceso de fabricación se realizan mediciones de temperatura del sistema calentador a dos temperaturas 60°C y 95°C . Los coeficientes de calibración, que corrigen los pequeños errores de las lecturas sin procesar que realiza la sonda de los calentadores, se almacenan en la memoria de cada módulo I-CORE.

El tubo de reacción que usa Smart Cyclor (**Figura 23**) es de $25\ \mu\text{l}$ y de polipropileno y está diseñado con unas buenas características térmicas y ópticas. Este tubo permite a la mezcla de reacción alcanzar rápidamente determinados puntos de calor y de refrigeración y, al mismo tiempo, permite realizar tareas de amplificación a gran velocidad.

También incluye dos ventanas de detección/excitación ópticas ubicadas en un ángulo de 90° entre sí a lo largo de los bordes inferiores del tubo. Estas ventanas ópticas interactúan con los bloques ópticos I-CORE para permitir la detección de emisiones y la excitación con fluorescencia.

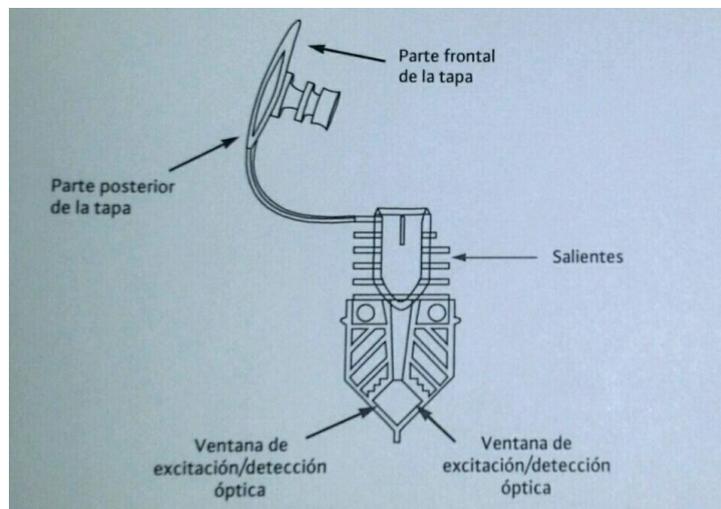


Figura 23. Tubos de Reacción para Smart Cyclor II

Explicado el funcionamiento de Smart Cyclor II seguimos el siguiente protocolo para bacterias en muestra de vino.

1) PREPARACIÓN REACTIVOS

➤ Reactivo de Lisis:

Puede permanecer preparado un tiempo a 4 °C.

Un tubo de reactivo de Lisis → 5 muestras.

Añadir 1,1 ml de Lysis Buffer por tubo y mezclar vigorosamente.

➤ Proteinasa K:

Puede permanecer preparada un tiempo a 4 °C.

Por cada muestra:

- 20 µl de Proteinasa k
- 200 µl de Qiagen Buffer AL
- 1 µl de IPC DNA

(El IPC se rehidrata con 68 µl de H₂O de Grado Biológico Molecular)

➤ Wash Buffer:

Puede permanecer preparado un tiempo a 4°C.

Para 10 muestras:

- 2 ml de Lysis Wash
- 1,2 ml de Etanol 100%
- 6,8 ml de H₂O de Grado Biológico Molecular.

2) PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- Tomar 100 ml de la muestra de vino. (El volumen concentrado de vino variará en función de en qué etapa se encuentre el vino)
- Centrifugar 5 minutos a 120.000 rpm en 2 tubos de 50 ml.
- Tras la centrifugación eliminamos el sobrenadante de uno de los tubos y resuspendemos el pellet con 5 ml del otro tubo. Luego tomamos esta mezcla para resuspender el otro precipitado.
- Tomar 1,5 ml de la resuspensión y llevarlo un eppendorf.
- Centrifugar 5 min a 120.000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante y quedarnos con el pellet.
- Secar bien el eppendorf sobre papel absorbente.
- Añadir 1ml de Wash Buffer y resuspender el pellet para lavar la muestra.
- Centrifugar 5 min a 120.000 rpm.
- Repetir el lavado con Wash Buffer si la muestra está muy sucia.

3) LISIS CELULAR

- Añadir 200 µl de reactivo de Lisis en cada muestra.
- Incubar 30 min a 37 °C.
- Mezclar bien con la mano.
- Incubar otros 30 min a 37 °C.
- Añadir 220 µl de Proteinasa K.

- Incubar 30 min a 60 °C.
- Centrifugar 1 min a 120.000 rpm.
- Transferir el sobrenadante a un eppendorf limpio asegurándonos de no recoger ningún sólido del fondo del tubo.
- Añadir 200 µl de Etanol absoluto.

4) EXTRACCIÓN DNA

- Llevar la muestra anterior a una columna de extracción de DNA.
- Centrifugar 1 min a 120.000 rpm y cambiar el dispensador.
- Añadir 500 µl de Buffer AW1.
- Centrifugar 1 min a 120.000 rpm y cambiar el dispensador.
- Añadir 500 µl Buffer AW2.
- Centrifugar 3 min a 120.000 rpm y cambiar el dispensador.
- Añadir 100 µl de Buffer AE.
- Esperar 2 min a T ambiente.
- Centrifugar 1 min a 120.000 rpm y conservar.
- Añadir de nuevo 100 µl de Buffer AE.
- Esperar 2 min a T ambiente.
- Centrifugar 1min a 120.000 rpm.
- Guardar el sobrenadante!!!
- El DNA extraído se puede conservar varias semanas a 4 °C.

A partir de ahora NO USAR VÓRTEX!!!!!!! MEZCLAR CON LA MANO o DAR UN PULSO.

5) PREPARACIÓN MÁSTER MIX

Lo realizamos con Scorpion Detection Reagents que pueden ser:

- Bacterias 1
- Bacterias 2
- Oenococcus

1 Scorpion Detection Reagents → 10 reacciones

Activar cada Scorpion Detection Reagent con 55 μl de H_2O de Grado Biológico Molecular (conservar máximo 2 semanas a 4°C)

- Máster Mix con reactivos Promega:

PCR MASTER MIX	Vol to add to 1 tube of Premix (for 100 rxn's)
GoTaq Hot Start Colorless Master Mix	1 tube
25 mM MgCl_2	200 μL
20% Polyvinylpyrrolidone K40 Solution*	45 μL
GoTaq Hot Start Polymerase	5 μL

*Preparación de 10mL de disolución 20% PVP: disolver totalmente 2 g de PVP en agua de grado biológico molecular. Filtrar con filtro estéril de 0,22 micras y preparar alícuotas de 1,5 ml. Conservar a -20 °C.

6) PREPARACIÓN MUESTRA PARA PCR

Añadimos a los tubos de reacción Smart Cyclor diferentes cantidades en μL de los siguientes reactivos:

- 15 μl de PCR Máster Mix
- 5 μl de Rehydrated Scorpions.
- 5 μl de la muestra.

Centrifugamos en centrífuga del equipo Smart Cyclor para que baje la disolución y que no queden burbujas en el fondo de la sepia.

Si vemos que quedan burbujas volvemos a centrifugar.

Introducimos ya las muestras en el equipo Smart Cyclor II.

El resultado final en cell/ml le damos teniendo en cuenta la concentración inicial de la muestra de vino de la cual partimos.

NOTA: Los reactivos que tengamos preparados a Tª de 4°C les damos un pulso de 30'' para evitar pérdidas por evaporación.

Las condiciones en las cuales debemos trabajar en el equipo Smart Cyclor II son las siguientes:

Stage 1

Hold

Temp	Secs	Optics
95	120	off

Stage 2

3 temp cycle repeat 50 times

Temp	Secs	Optics
95	15	off
55	25	on
72	35	off

4. RESULTADOS

- Para el Cultivo Tradicional en placa se obtuvieron los siguientes resultados.

Cultivo en Placa

MUESTRA	Bacterias Totales	Bacterias Acéticas	Bacterias Lácticas	Oenococcus
Dep 1-4	2,0X10 ⁵	4,2X10 ⁴	1,4X10 ⁵	1,3X10 ⁵
Dep 5-8	2,5X10 ⁵	5,4X10 ⁴	1,8X10 ⁵	1,5X10 ⁵
Dep 9-15	2,3X10 ⁵	6,5X10 ⁴	1,5X10 ⁵	1,9X10 ⁵

Nota: Resultado en ufc/ml

- Para la Epifluorescencia se obtuvieron los siguientes resultados:

Epifluorescencia

MUESTRA	Bacterias Acéticas	Bacterias Lácticas	Oenococcus
Dep 1-4	7,8x10 ⁴	1,2x10 ⁶	1,0x10 ⁶
Dep 5-8	8,5x10 ⁴	1,1x10 ⁶	9,7x10 ⁵
Dep 9-15	9,2x10 ⁴	1,1x10 ⁶	9,8x10 ⁵

Nota: Resultados en células / ml.

PCR

-Para PCR se obtuvieron los siguientes resultados:

MUESTRA	Acetobacter	L. brevis	L. casei	Pediococcus	L. plantarum	L. kunkeei	Oenococcus
Dep 1-4	1,6x10 ⁴	<10 cells/ml	<10 cells/ml	3,8 x10 ⁻¹	<10 cells/ml	<10 cells/ml	4,9 x10 ⁵
Dep 5-8	1,9x10 ⁴	2,0 x10 ⁻²	<10 cells/ml	4,0 x10 ⁻¹	<10 cells/ml	<10 cells/ml	5,0 x10 ⁵
Dep 9-15	1,6x10 ⁴	1,0 x10 ⁻²	<10 cells/ml	5,4 x10 ⁻¹	<10 cells/ml	<10 cells/ml	4,5 x10 ⁵

Nota: Resultados en células / ml.

5. CONCLUSIONES

- 1) El recuento de bacterias viables obtenido por Epifluorescencia en nuestras experiencias es más rápido y da mejores resultados en cuanto a la población de bacterias viables, con respecto al que se obtiene mediante recuento en medio de cultivo tradicional y por PCR. La diferencia con los otros métodos es que permite identificar la población de bacterias en un estado VNC. Observamos que el número de bacterias Lácticas en Epifluorescencia es prácticamente el mismo que el de *Oenococcus Oeni* por lo que podemos concluir que las bacterias Lácticas que existen en este vino son *Oenococcus Oeni*. Dato que coincide con las otras dos técnicas. Al igual que ocurre con las bacterias acéticas comparando las técnicas.
- 2) El uso del Kit LIVE/DEAD. BacLight™ facilita un resultado rápido y cuantitativo, puesto que podemos monitorizar el proceso de implantación en el vino sin necesidad de realizar cultivos que supondrían una semana de crecimiento a 28°C y posteriores pruebas moleculares con reactivos más caros.
- 3) Con este método se pueden obtener datos de una gran parte de la población de bacterias que no crece en medio sólido pero que permanece en el vino en un estado VNC. Estas bacterias pueden ser en algunos casos de importancia para la realización de la FML porque están metabólicamente activas, aunque no sean capaces de crecer en medio sólido.
- 4) Como conclusión final, podemos decir que esta técnica de la Epifluorescencia supone una metodología rápida, sensible, reproducible y de fácil manejo en el laboratorio, además de poseer las ventajas de los métodos rápidos e independientes de cultivo y de PCR a tiempo real, por lo que es altamente aplicable en enología. Pero no se debe olvidar que unas técnicas son complementarias de otras y que se pueden aplicar indiferentemente según las necesidades de cada bodega.

6. BIBLIOGRAFÍA.

Andreas Kortekamp. 2005. Growth, occurrence and development of septa in *Plasmopara viticola* and other members of the Peronosporaceae using light- and epifluorescence-microscopy. *Mycol. Res.* 109 (5): 640–648.

Avrameas S. , Breeuwer P. , Dronne S. , Bruetschy Alice , Cuinier C. 1996. Mesures de l'activité fermentaire de levures oenologiques par cytométrie en flux .

Symposium International d' Oenologie págs. 221-224.

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 Biochemistry* 41 1160–1164.

Berta, P. y Spertino, M. 1998. Nuove tecniche di determinazione di lieviti e batteri in epifluorescenza. *L' enotecnico*. pp. 57-61.

Blasco Lucía, Ferrer Sergi, Pardo Isabel. 2003. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for in situ identification of wine lactic acid bacteria. *Fems Microbiology Letters* 225 115-123.

Bleve, G., L. Rizzotti, F. Dellaglio, and S. Torriani. 2003. Development of Reverse Transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4116-4122.

Brinkman, N. E., R. A. Haugland, L. J. Wymer, M. Byappanahalli, R. L. Whitman, and S. J. Vesper. 2003. Evaluation of a rapid, quantitative real-time PCR method for enumeration of pathogenic *Candida* cells in water. *Appl. Environ. Microbiol* 69, 1775-1782.

Callejón Sara, Pardo Isabel, Ferrer Sergi. 2007. Empleo del kit de fluorescencia Live/Dead para el seguimiento de la viabilidad de cultivos iniciadores inoculados en vino. *Avances en Ciencias y Técnicas Enológicas*.

Casey, G.D. and Dobson, A.D. 2004. Potential of using real-time PCR-based detection of spoilage yeast in fruit juice—a preliminary study. *Int. J. Food Microbiol.* 91, 327-335.

Charles G. Edwards. 2005. Microbes and sediments in Wine, Beer and Juice.

Divol B. and Lonvaud-Funel A. 2005. Evidence for viable but non culturable yeasts in botrytis-affected wine. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 85–93.

González, A., Hierro, N., Poblet, M., Mas, A. and Guillamón, J.M. 2006. Enumeration and detection of acetic acid bacteria by real-time PCR and nested-PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 254, 123-128.

Graham L. Pettipher and Ubaldina Rodrigues M. 1982. Rapid Enumeration of Microorganisms in Foods by the Direct Epifluorescent Filter Technique. *Applied and environmental microbiology*, p. 809-813 *American Society for Microbiology Vol. 44, No. 4.*

Graham L. Pettipher, Roderick Mansell, Charles H. Mckinnon, and Christina M. Cousins. 1980. Rapid Membrane Filtration-Epifluorescent Microscopy Technique for Direct Enumeration of Bacteria in Raw Milk. *Applied and environmental microbiology*, Feb., p. 423-429 *Vol. 39, No. 2.*

Kopke A., Cristovao C., Prata A. M., Silva Pereira C., Figueiredo Marques J. J., San Romao M.V. 2000. The application of epifluorescence microscopy method as a rapid Technique Microbiological control of wine. *Food Microbiology*, 17, 257-260.

Lyons, S.R., Griffen, A.L. and Leys, E.J. 2000. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2362-2365.

Malacrinò Paola, Zapparola Giacomo, Torriani Sandra, Dellaglio Franco. 2001. Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods Volume 45, Pages 127–134.*

Mesa M. M., Macías M., Cantero D., and Barja F. 2003. Use of the Direct Epifluorescent Filter Technique for the Enumeration of Viable and Total Acetic Acid Bacteria from Vinegar Fermentation. *Journal of Fluorescence*, Vol. 13, No.

Millet, V., Lonvaud-Funel, A. 2000. The viable but non-culturable state of wine microorganisms during storage. *Letters in Applied Microbiology* 30, 126-141.

Molecular Probes. 2004. LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits .

Nielsen, Jan Clair; Claus Prahil & Aline Lonvaud-Funel 1996. Malolactic Fermentation in Wine by Direct Inoculation with Freeze-Dried *Leuconostoc oenos* Cultures. *Am. J. Enol. Vitic. (American Society for Enology and Viticulture)* 47(1): pp. 42-48.

Oliver, J.D. 1993 .Formation of viable but non culturable cells. In S. Kjelleberg (ed.), p.239-272.

Pilatte E. y Alexandre H. 2005.Microorganismos de la uva y el vino. *Sarl Microvitis*.

Pinzani, P., Bonciani, M., Pazzagli, C., Orlando, S., Guerrini, S. and Granchi, L. 2004. Rapid detection of *Oenococcus oeni* in wine by real-time quantitative PCR. *Appl. MicrobiolLett.* 38, 118-124.

Puértolas E., López N., Condón S., Raso J., Álvarez I. 2009. Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria International. *Journal of Food Microbiology* 130 49–55.

Qvist S.H., Jakobsen M. 1985. Application of the direct epifluorescent filter technique as a rapid method in microbiological quality assurance in the meat industry International *Journal of Food Microbiology*, 2; 139-144

Sohier D. and Lonvaud-Funel A. 1998. Rapid and sensitive in situ hybridization method for detecting and identifying lactic acid bacteria in wine. *Food Microbiology*, 15, 391-397.

Trama, J.P., Mordechai, E. and Adelson, M.E. 2005. Detection and identification of *Candida* species associated with *Candida* vaginitis by real-time PCR and pyrosequencing. *Mol. Cell Probes.* 19, 145-152.

Ubalдина M., Rodrigues and Rohan G. Kroll. 1989. Epifluorescence Microscopy for Selective Enumeration of Injured Bacteria in Frozen and Heat-Treated Foods *Applied and environmental microbiology*, p. 778-787

Ubeda J.F., Briones A.I. 1999. Microbiological quality control of filtered and non-filtered wines. *Food Control* 10; 41-45

Usseglio-Tomasset, 1998. L. Química enológica. *Ediciones Mundi-prensa capítulo V. pag. 73.*

Ward, O.P. 1991. Biotecnología de la fermentación. *Acribia, S.A.*

Williams S.C., Hong Y., Danavall D.C.A., Howard-Jones M.H. , Gibson D., Frischer M.E., Verity P.G. 1998. Distinguishing between living and non living bacteria: Evaluation of the vital stain propidium iodide and its combined use with molecular probes in aquatic samples. *Journal of Microbiological Methods* 32 225–236.

Zamora Marín, F., 2003. Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos. *Ediciones Mundi-Prensa*.

