

EMPLEO DEL KIT DE FLUORESCENCIA LIVE/DEAD PARA EL SEGUIMIENTO DE LA VIABILIDAD DE CULTIVOS INICIADORES INOCULADOS EN VINO

Sara Callejón, Isabel Pardo, Sergi Ferrer

ENOLAB – Laboratorio de Microbiología Enológica, Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia.
Dr. Moliner, 50. 46100 Burjassot (Valencia). 963543145. Sara.Callejon@uv.es

Resumen:

El kit de viabilidad contiene el fluorocromo SYTO9 que es una pequeña molécula que puede penetrar en las bacterias que poseen intacta la membrana plasmática, proporcionando una fluorescencia verde, y el fluorocromo IP (ioduro de propidio) penetra a través de las membranas dañadas, por lo tanto no viables, proporcionando fluorescencia de color rojo. Se han hecho modificaciones en el protocolo de aplicación de esta técnica para resolver los problemas que se presentaron en su uso en vino. La aplicación de esta técnica permite estimar el número y estado fisiológico de cultivos iniciadores inoculados en vino para realizar la fermentación maloláctica.

Se inoculó un cultivo iniciador en un vino, y se tomaron muestras durante los seis días posteriores a su inoculación, fecha en la cual este cultivo ya había degradado todo el ácido málico.

La viabilidad de las bacterias obtenida por esta metodología se comprobó mediante recuento en placa. Los resultados se mostraron coincidentes al recuento mediante fluorocromos.

La aplicación de fluorocromos permite estimar la viabilidad de las células inoculadas y realizar recuento de vivas y muertas en un breve período de tiempo sin necesidad de recurrir a métodos que requieran del cultivo y largos periodos de incubación.

Palabras clave: SYTO9, Ioduro de propidio, Fermentación maloláctica, cultivo iniciador, viabilidad.

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas (BAL) llevan a cabo la fermentación maloláctica (FML) en el vino, que supone la transformación de ácido málico (dicarboxílico) en ácido láctico (monocarboxílico). La FML es un proceso imprescindible para la obtención de vinos tintos de calidad, y sobre todo en aquellos que van a ser sometidos a un proceso de envejecimiento en bodega. Con la FML se consigue una reducción de la acidez del vino, así como una mayor estabilidad microbiológica y complejidad en los aromas del vino. Las especies directamente relacionadas con la FML de los vinos son *Oenococcus oeni*, y en menor medida otras BAL.

Las BAL también pueden provocar alteraciones de los vinos dando lugar a una pérdida en la calidad del mismo, por lo que surge la necesidad de controlar la FML de los vinos. Una práctica cada vez más habitual en las bodegas es la adición de cultivos bacterianos seleccionados iniciadores de la FML con el fin de conseguir un mayor control microbiológico del proceso. Los cultivos iniciadores de la FML comercializados en la actualidad están constituidos por cepas de la especie *O. oeni* aisladas de vinos y seleccionadas para conferir las mejores características con una alta eficacia fermentativa.

Se ha adaptado al vino una técnica microscópica rápida de recuento de células y seguimiento del estado fisiológico de *O. oeni*. Esta técnica evita los problemas derivados de los métodos tradicionales de recuento, como la elección de un medio de cultivo adecuado, la utilización de atmósferas controladas (anaerobiosis) y los largos periodos de incubación. Esta técnica está basada en la tinción de las células con

el Kit LIVE/DEAD® BacLight™ (Molecular Probes) que contiene dos marcadores de ácidos nucleicos (SYTO9 y IP). El fluorocromo SYTO9 es una pequeña molécula que puede penetrar en las bacterias que poseen intacta la membrana plasmática, proporcionando una fluorescencia verde. El fluorocromo IP penetra en las membranas dañadas, por lo tanto no viables, proporcionando una fluorescencia de color rojo.

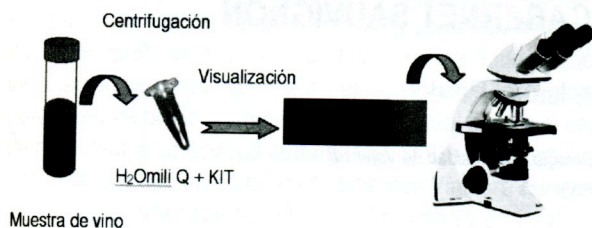
2. MATERIAL Y MÉTODOS

Se procedió a la inoculación en vino de un cultivo de *O. oeni* iniciador de la fermentación maloláctica, en dos concentraciones celulares y dos condiciones distintas: a una parte del cultivo se le realizó un tratamiento de preadaptación con HCl y etanol [3], y la otra no se modificó. Se tomaron muestras de estos vinos y se siguió el estado fisiológico de las células y su número a lo largo del tiempo mediante fluorescencia y por recuento en medio sólido.

Las muestras destinadas al recuento por fluorescencia fueron centrifugadas a 3000 rpm durante cinco minutos para eliminar levaduras y el sobrenadante fue de nuevo centrifugado a 13000 rpm para obtener las células bacterianas, a continuación se resuspendieron en 100 µl de H₂O miliQ estéril y se añadieron 0.3 µl del Kit LIVE/DEAD®, se dejaron incubando a temperatura ambiente y oscuridad quince minutos y se colocaron 5 µl de la muestra en los pocillos escavados del porta mostrado en la figura 1, para su visualización en el microscopio de fluorescencia. Se utilizó como agente de prolongación de la fluorescencia Vectashield.



Fig. 1. Protocolo resumido de aplicación del kit de Viabilidad LIVE/DEAD®



Los recuentos microscópicos de bacterias viables fueron obtenidos mediante el empleo del Kit LIVE/DEAD®. Se consideraron viables las células con fluorescencia de color verde, y no viables las que presentaban color rojo. En algunas células se observaron colores amarillentos o anaranjados que serían propios de bacterias dañadas en parte y con estados de viabilidad intermedios; éstas podrían equivaler a células en estado "viable no cultivable" (VNC) [1]. Para este trabajo, dado que en cualquier caso no darían lugar a colonias en las placas de cultivo, se consideraron como muertas.

Con el fin de poder comparar los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia y los obtenidos por el método tradicional de recuento en placa, se procedió a contar las cadenas de *O. oeni* visualizadas al microscopio y no células individuales, ya que cada cadena da lugar a una colonia en medio sólido.

3. RESULTADOS

La preadaptación del cultivo iniciador con etanol y HCl a las condiciones del vino, no dio lugar a una importante mejoría en la viabilidad final del cultivo. Se observaron solamente algunos aumentos de viabilidad en varios de los casos tras un día de permanencia en vino, y solamente en un caso al final de la FML (Tabla 1).

Tabla 1. Concentración del inóculo en los vinos 1 y 2. Comparación de los resultados obtenidos al siguiente día de la inoculación y al final de la fermentación maloláctica (FFML) con los sistemas de recuento mediante el kit de viabilidad y el recuento en placa.

TOTALES EN EL INÓCULO	PREADAPTACIÓN	RECuento VIABLES KIT		RECuento PLACA	
		1 día	FFML	1 día	FFML
VINO 1					
9.00E+05	+	7,61E+05	7,93E+05	7,00E+05	1,60E+05
	-	7,47E+05	6,16E+05	4,00E+05	1,10E+05
9.00E+06	+	8,39E+06	7,25E+06	1,80E+06	2,60E+05
	-	7,33E+06	7,43E+06	1,00E+06	3,00E+05
VINO 2					
9.00E+05	+	7,33E+05	6,30E+05	1,00E+06	1,00E+05
	-	5,54E+05	6,37E+05	1,00E+06	2,00E+05
9.00E+06	+	7,43E+06	6,73E+06	3,00E+05	1,50E+05
	-	6,53E+06	7,68E+06	8,00E+05	1,00E+05

El recuento de bacterias viables obtenido por fluorescencia es siempre mayor al que se obtiene mediante recuento en medio sólido, por lo que la diferencia supone un estado en las células VNC [1-2]. Este grupo de VNC llegó a alcanzar desde un 7% hasta 40% en este estudio (Tabla 1).

Se observa también una disminución en el número de colonias crecidas en las placas de recuento para las muestras al final de la FML respecto al primer día de permanencia en vino; esta disminución no es tan acusada cuando se estima el estado metabólico de las células mediante el kit de viabilidad. Se observa incluso un ligero aumento con esta última técnica en casi todos los casos en los que no se ha realizado la preadaptación del cultivo. Sin embargo, los cultivos preadaptados perdían algo de viabilidad en ese tiempo.

4. CONCLUSIONES

El uso del Kit LIVE/DEAD® BacLight™ facilita un resultado rápido y cuantitativo del estado fisiológico del cultivo iniciador de la FML, 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 las posteriores pruebas moleculares.

Además con este método se pueden obtener datos de una gran parte de la población láctica 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.

Este sistema 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, por lo que es altamente aplicable en bodega.

5. BIBLIOGRAFÍA

- MILLET, V.; LONVAUD-FUNEL, A. 2000. **The viable but non-culturable state of wine micro-organisms during storage.** *Letters in Applied Microbiology* 30 136 – 141.
- MORENO, Y.; COLLADO, MC.; FERRÚS, MA.; COBO, JM.; HERNÁNDEZ, E.; HERNANDEZ, M. 2006. **Viability assessment of lactic acid bacteria in commercial dairy products stored at 4°C using LIVE/DEAD® BacLight™ staining and conventional plate counts.** *International Journal of Food Science and Technology* 41 275 – 280.
- GRAÇA DA SILVEIRA, M.; SAN ROMAO, M.V.; LOUREIRO-DIAS, M.C.; ROMBAUX, F.M.; ABBE, T. 2002. **Flor citometric assessment of membrana integrity of ethanol stressed *Enococcus oeni* cells.** *Applied and Environmental Microbiology* 68 6087-6083.